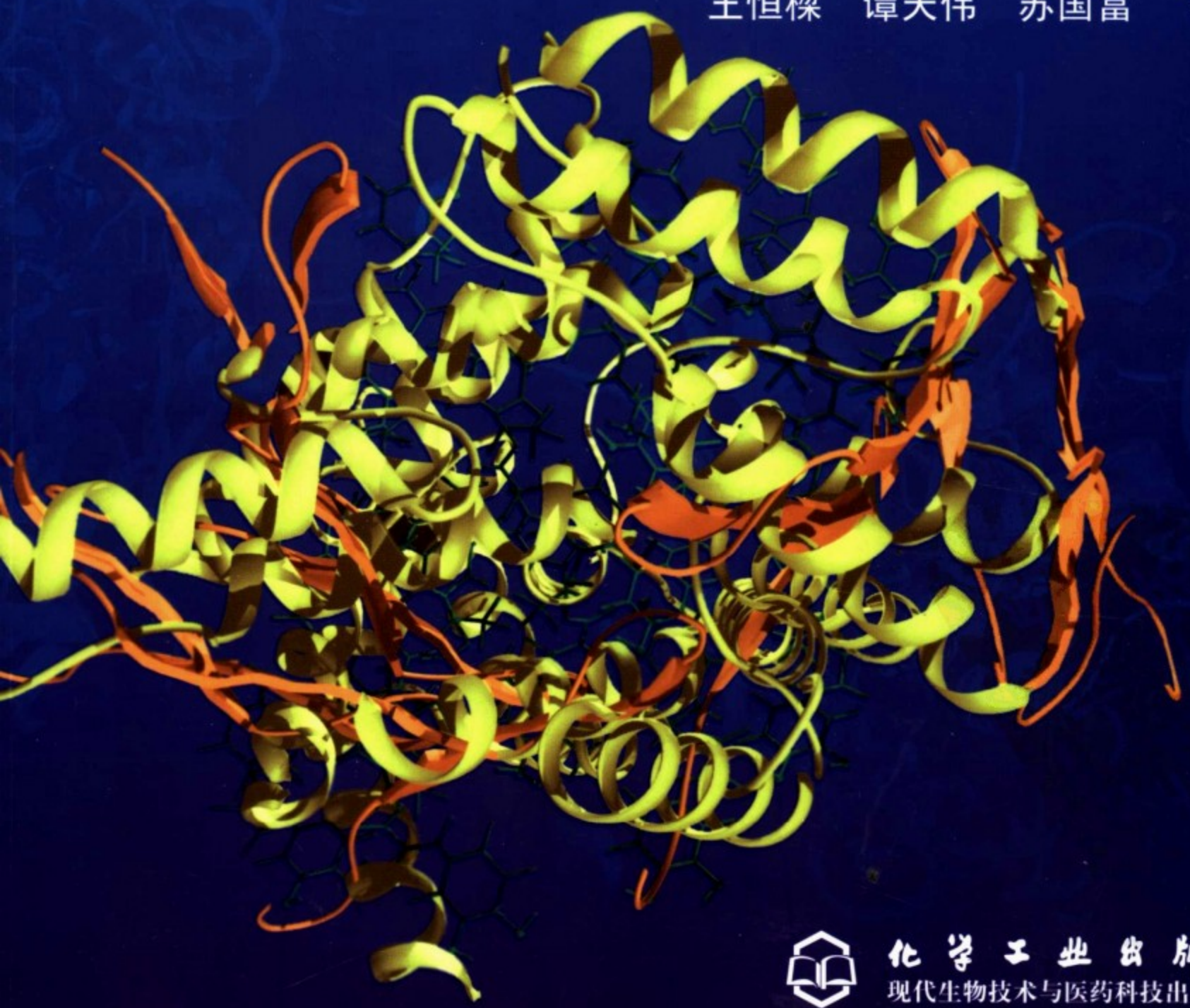
Proteins Biochemistry and Biotechnology

蛋白质生物化学与生物技术

[爱尔兰] G.沃尔什 (Gary Walsh) 著

王恒樑 谭天伟 苏国富 等译



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

Proteins
Biochemistry and Biotechnology
蛋白质生物化学与生物技术

内容导读

- 蛋白质理论与技术方面的权威论著
- 对早先出版并广受赞誉的《蛋白质生物技术》（“Protein Biotechnology”）一书的拓展、延伸和更新
- 汇编了大量的新资料，包含更多的“纯”生物化学内容和与国际同步的应用现状

相关评论

- “很少有教科书能与其竞争，本书具有比较好的优势。”

—— *Biochemistry and Molecular Education*, July/August 2002

- “汇集了大量关于蛋白质的标准参考资料，任何分子生物学家都可以从这本优秀的图书中受益。希望沃尔什博士不断地将本书修订下去……”

—— *Engineering in Life Sciences*, 2004, Vol 5, No.5

ISBN 7-5025-8149-9
9 787502 581497 >

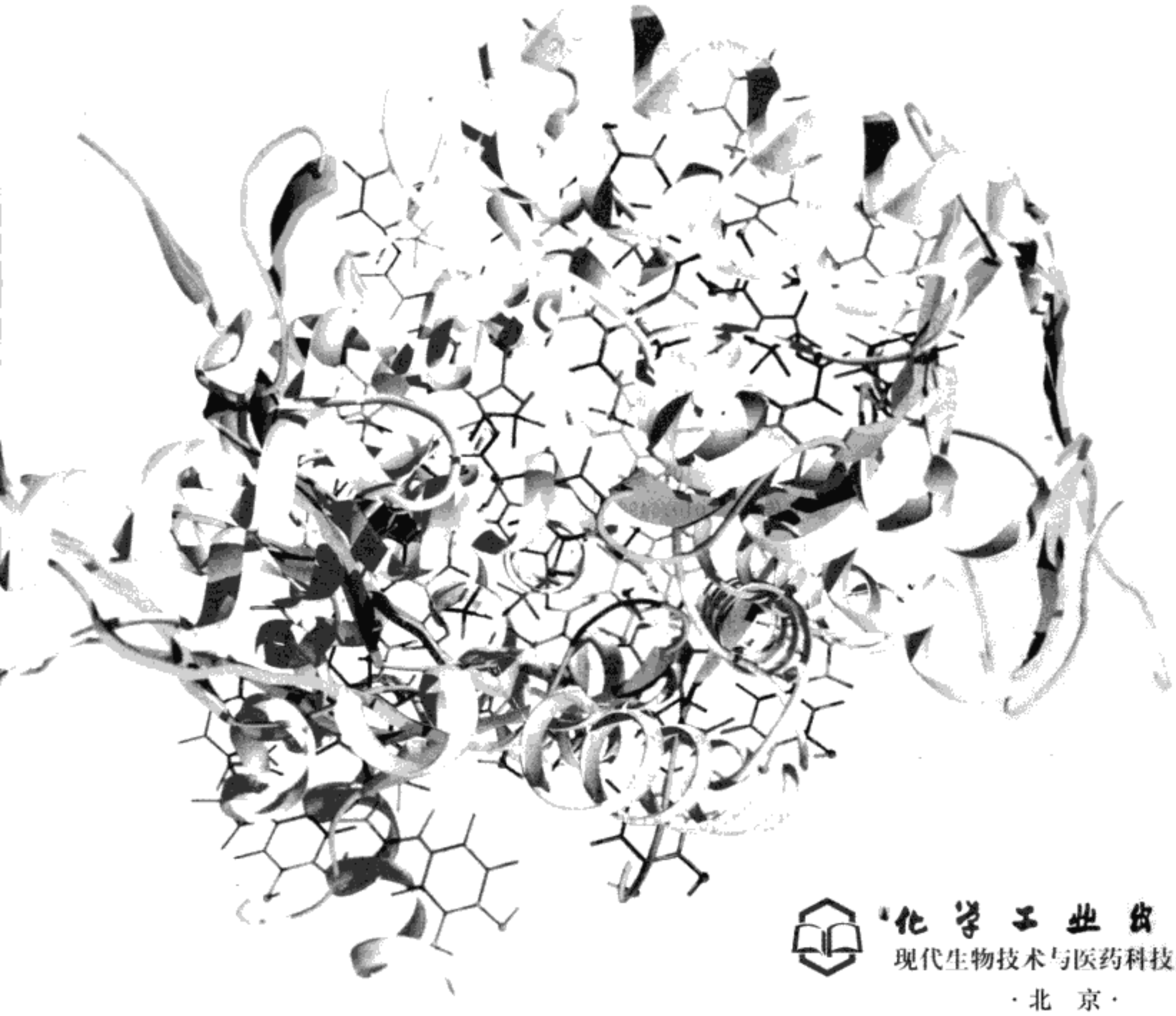
销售分类建议：生物/生物技术
ISBN 7-5025-8149-9 定价：49.00元

Proteins
Biochemistry and Biotechnology

蛋白质生物化学与生物技术

[爱尔兰] G.沃尔什 (Gary Walsh) **著**

王恒樑　谭天伟　苏国富　**等译**



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心
·北　京·

图书在版编目（CIP）数据

蛋白质生物化学与生物技术/［爱尔兰］沃尔什（Walsh，G.）著；王恒樑等译. —北京：化学工业出版社，2005.12

书名原文：Proteins Biochemistry and Biotechnology

ISBN 7-5025-8149-9

Ⅰ.蛋… Ⅱ.①沃…②王… Ⅲ.①蛋白质-生物化学②蛋白质-生物技术 Ⅳ.Q510.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2005）第 157960 号

Proteins Biochemistry and Biotechnology/by Gary Walsh

ISBN 0471899070

Copyright©2002 by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by John Wiley & Sons Ltd.

本书中文简体字版由 John Wiley & Sons 出版公司授权化学工业出版社独家出版发行。

未经许可，不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号：01-2004-1426

蛋白质生物化学与生物技术

［爱尔兰］G. 沃尔什 著

王恒樑 谭天伟 苏国富 等译

责任编辑：郎红旗 傅四周 周 旭

责任校对：宋 玮

封面设计：胡艳玮

*

化 学 工 业 出 版 社

现代生物技术与医药科技出版中心 出版发行

（北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029）

购书咨询：(010)64982530

(010)64918013

购书传真：(010)64982630

http://www.cip.com.cn

*

新华书店北京发行所经销

大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市延风装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 21¼ 字数 514 千字

2006 年 3 月第 1 版 2006 年 3 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8149-9

定 价：49.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者，本社发行部负责退换

译者名单（按姓氏汉语拼音排序）

董函竹　北京化工大学生命科学与技术学院
高荣凯　中国人民解放军海军总医院中心实验科
侯利华　军事医学科学院微生物流行病研究所
贾丽娜　北京化工大学生命科学与技术学院
阚微娜　北京化工大学生命科学与技术学院
李　霆　军事医学科学院生物工程研究所
史兆兴　军事医学科学院生物工程研究所
苏国富　军事医学科学院生物工程研究所
谭天伟　北京化工大学生命科学与技术学院
王恒樑　军事医学科学院生物工程研究所
王军军　军事医学科学院生物工程研究所
王宇新　军事医学科学院生物工程研究所
许凌峰　军事医学科学院生物工程研究所
袁　静　军事医学科学院生物工程研究所
岳俊杰　军事医学科学院生物工程研究所
张　艳　北京化工大学生命科学与技术学院
赵　颖　北京化工大学生命科学与技术学院
周晓巍　军事医学科学院生物工程研究所

译序

应译者之邀，代为中译本作序。1953 年詹姆斯·沃森和弗兰西斯·克里克发现了 DNA 的双螺旋结构，1972 年美国科学家伯格首创基因重组技术，开辟了现代生命科学研究的新时代。从此核酸的分离纯化、克隆和表达的研究进展迅速，并取得令人瞩目的成就，因此也出版了不少与此有关的书籍。1990 年人类基因组计划启动，并且其草图已在 2003 年完成，极大地促进了功能基因组学和蛋白质组学的研究，意味着未来现代生物技术的研究重点将由生命的遗传物质转移到生命功能的执行者——蛋白质。为了适应生物高技术发展的需要，军事医学科学院生物工程研究所和北京化工大学生命科学与技术学院的一些中青年科技工作者和教师在较短的时间内译出本书。

本书是关于蛋白质的生物化学和生物技术的专著，全面介绍了迄今为止的蛋白质研究概况，前 3 章着重介绍蛋白质的生物化学特性，其余 10 章是关于蛋白质的制备和它们在医学、分析和工业上的应用。本书不仅适用于生物化学专业的本科生，对生命科学领域相关专业的研究生和从事生物技术研究的科研工作者也是一本有益的参考书。

黄翠芬

中国工程院院士

军事医学科学院生物工程研究所研究员，名誉所长

2005 年 10 月

前言

本书是 John Wiley & Sons 出版公司于 1994 年出版的《蛋白质生物技术》的延伸，旨在全面介绍迄今为止蛋白质研究的概况，着重介绍蛋白质的生物化学和应用。第 1～3 章主要讲述蛋白质的生物化学基本原理，涉及蛋白质的来源、结构、折叠、稳定性、定量、纯化和鉴定。其余 10 章主要介绍蛋白质的制备及其在医学、分析技术和工业过程中的应用。

本书主要是为了满足生物技术专业学生的需要，但是应该也适合于生物化学、微生物学或生物医学等其他相关学科的研究生，而且对目前正在从事生物技术研究的科研人员也有重要的参考价值。

在此，我真诚地感谢对圆满完成本书作出贡献的有关人员：Sandy 自始至终都能很好地理解我的思想，她把我的许多原始草图（有的与抽象画没有多大区别）绘制成清楚易懂的图表；感谢 Kate 和 Grainne 在百忙之中帮助打印图表；感谢 Gerard Wall 对于蛋白质工程方面的许多有益讨论；也要感谢 Nancy，当我解释要为出版该书而不能帮助她承担一些家务时，她总是毫无怨言；当然，我也要感谢我的《蛋白质生物技术》的合作者 Denis Headon，他是我的良师益友，多年来一直鼓励着我；同时，感谢 John Wiley & Sons 出版公司的敬业精神和工作效率，以及对我延误交付手稿的宽容。另外，我还要对那些出版商表示感谢，因为他们允许我复制一些有版权的资料。

最后，谨以此书献给我所熟悉的最神奇和最珍贵的蛋白质组合——我漂亮的小女儿 Eithne。

G. 沃尔什

Gary Walsh

2001 年 6 月

内 容 提 要

这是一本蛋白质理论与技术方面的系统论著，书中汇集了蛋白质领域研究人员关注的权威信息资源，并对蛋白质在医药、分析技术以及工业过程中的应用进行了全面的总结。

本书原著是对早先出版并受到广泛关注的《蛋白质生物技术》（“Protein Biotechnology”）一书的全面拓展和延伸，由国内相关领域的科研一线专家翻译成中文，旨在提供给读者蛋白质技术方面国际上的最新进展与大量的相关研究案例。前面几章集中讲述蛋白质的结构、折叠、稳定性、纯化和鉴定，后文详细探讨蛋白质的工业化生产及其在医药、分析技术和工业过程中的应用。

本书对于生物技术、生物化学、微生物学与分子生物学专业本科生的学习和研究具有很大的参考价值，对于医学、药学和生物医学等领域从事蛋白质研究的人员也很有帮助，同时还是生物技术与生物制药工业的管理者和科学家的一本理想的参考书。

目录

第 1 章　蛋白质的结构 …… 1
1.1　引言 …… 1
1.2　蛋白质的结构概述 …… 1
1.2.1　一级结构 …… 2
1.2.2　肽键 …… 6
1.2.3　氨基酸序列测定 …… 6
1.2.4　多肽合成 …… 11
1.3　高级结构 …… 11
1.3.1　二级结构 …… 11
1.3.2　三级结构 …… 13
1.3.3　高级结构测定 …… 16
1.4　蛋白质的翻译后修饰 …… 18
1.4.1　蛋白酶水解过程 …… 18
1.4.2　糖基化 …… 18
1.4.3　磷酸化 …… 20
1.4.4　乙酰化、酰化、氨基化 …… 21
1.5　蛋白质的稳定性和折叠 …… 22
1.5.1　折叠途径 …… 25
1.5.2　蛋白质工程 …… 27
1.6　进一步的阅读材料 …… 29

第 2 章　蛋白质的来源 …… 32
2.1　引言 …… 32
2.2　微生物作为蛋白质的来源 …… 33
2.2.1　基因工程菌生产蛋白质 …… 35
2.2.2　大肠杆菌生产异源蛋白 …… 35
2.2.3　酵母菌生产异源蛋白 …… 38
2.2.4　真菌生产异源蛋白 …… 39
2.3　植物蛋白质 …… 40
2.4　动物组织作为蛋白质的来源 …… 43

2.4.1 转基因动物生产异源蛋白 …… 44
2.4.2 用动物细胞培养生产异源蛋白 …… 46
2.4.3 昆虫细胞培养系统 …… 47
2.5 直接化学合成 …… 48
2.6 结论 …… 50
2.7 进一步的阅读材料 …… 50

第3章 蛋白质的纯化与鉴定 …… 53
3.1 引言 …… 53
3.2 蛋白质的初步回收 …… 56
3.2.1 细胞破碎 …… 56
3.2.2 微生物细胞破碎 …… 57
3.3 去除完整细胞和细胞碎片 …… 58
3.3.1 离心 …… 58
3.3.2 过滤 …… 58
3.3.3 双水相分离 …… 60
3.3.4 核酸和脂类的去除 …… 62
3.4 浓缩和初步纯化 …… 63
3.4.1 沉淀浓缩 …… 63
3.4.2 离子交换浓缩 …… 64
3.4.3 超滤浓缩 …… 65
3.4.4 渗滤 …… 67
3.5 柱层析 …… 67
3.5.1 空间排阻层析（凝胶过滤层析） …… 68
3.5.2 离子交换层析 …… 71
3.5.3 疏水作用层析 …… 74
3.5.4 亲和层析 …… 76
3.5.5 羟基磷灰石层析 …… 81
3.5.6 聚焦层析 …… 82
3.5.7 基于双水相分离的蛋白质层析 …… 82
3.5.8 蛋白质的高效液相层析 …… 83
3.5.9 膨胀床层析 …… 85
3.5.10 膜层析 …… 87
3.5.11 重组蛋白的纯化 …… 88
3.6 蛋白质的失活和稳定性 …… 89
3.6.1 化学失活 …… 90
3.6.2 生物或物理因素导致的失活 …… 92
3.6.3 稳定蛋白质的方法 …… 93
3.6.4 冷冻干燥 …… 94
3.6.5 蛋白质的微量纯化 …… 96

3.7 蛋白质的鉴定 …… 96
3.7.1 功能研究 …… 97
3.7.2 纯度证明 …… 98
3.7.3 分子量的测定——质谱 …… 100
3.8 进一步的阅读材料 …… 101

第4章 大规模蛋白质纯化 …… 104
4.1 一些基本原则 …… 104
4.1.1 蛋白质纯化的规模化 …… 105
4.1.2 纯化系统的规模化 …… 106
4.1.3 大批量蛋白质生产 …… 107
4.1.4 治疗或诊断用途的蛋白质的纯化 …… 109
4.2 治疗性蛋白质产品——一些特殊的问题 …… 110
4.2.1 清洁区 …… 111
4.2.2 清洁、去污染和消毒 …… 111
4.3 蛋白质类治疗性产品中杂质的种类及其在医学上的意义 …… 113
4.3.1 微生物污染物 …… 113
4.3.2 病毒污染物 …… 114
4.3.3 热原质污染物 …… 115
4.3.4 DNA 污染物 …… 118
4.3.5 蛋白质污染物 …… 118
4.3.6 化学和非细胞污染物 …… 119
4.4 终产品的标记与包装 …… 120
4.5 进一步的阅读材料 …… 120

第5章 用于治疗的蛋白质——血液制品和疫苗 …… 122
5.1 引言 …… 122
5.2 血液制品 …… 122
5.2.1 全血和血浆 …… 122
5.2.2 源于血液的蛋白质 …… 123
5.2.3 血液凝集因子——生物化学和功能 …… 123
5.3 血友病 A 和血友病 B …… 125
5.3.1 医用的凝血因子产品 …… 125
5.3.2 重组血液因子 …… 126
5.3.3 非遗传的凝固疾病 …… 126
5.4 抗凝血剂 …… 128
5.4.1 传统的抗凝血剂 …… 128
5.4.2 水蛭素 …… 129
5.4.3 安克洛 …… 130
5.5 血栓溶解剂 …… 130

5.5.1 纤维蛋白溶解系统 …… 130
5.5.2 以组织纤溶酶原激活剂为基础的产品 …… 131
5.5.3 其他血栓溶解剂 …… 131
5.6 其他血液相关制剂 …… 132
5.6.1 人血清白蛋白 …… 132
5.6.2 α_1-抗胰蛋白酶 …… 133
5.6.3 血液代用品 …… 133
5.7 疫苗技术 …… 135
5.7.1 传统疫苗 …… 135
5.7.2 重组疫苗 …… 136
5.7.3 以乙型肝炎为基础的重组疫苗 …… 137
5.7.4 设计疫苗的其他方法 …… 138
5.7.5 抗独特型抗体作为疫苗 …… 138
5.8 艾滋病疫苗 …… 139
5.8.1 癌症疫苗 …… 140
5.8.2 佐剂技术 …… 141
5.9 进一步的阅读材料 …… 141

第 6 章 治疗用抗体和酶 …… 144
6.1 引言 …… 144
6.2 应用于体内的抗体 …… 144
6.2.1 多克隆抗体制剂 …… 144
6.2.2 单克隆抗体 …… 146
6.2.3 杂交瘤技术 …… 148
6.2.4 已获批准体内应用的抗体 …… 149
6.2.5 基于抗体的肿瘤检测和杀伤 …… 150
6.2.6 治疗用抗体——初始效果令人失望 …… 151
6.2.7 嵌合和人源化抗体 …… 151
6.2.8 肿瘤表面抗原特异性 …… 153
6.2.9 应用于临床的抗体的制备 …… 153
6.3 治疗用酶类 …… 155
6.3.1 天冬酰胺酶 …… 155
6.3.2 清创和抗炎制剂 …… 156
6.3.3 辅助消化的酶类 …… 157
6.3.4 超氧化物歧化酶 …… 157
6.3.5 囊性纤维症的核酸酶治疗 …… 158
6.3.6 葡糖脑苷脂酶 …… 159
6.4 进一步的阅读材料 …… 159

第 7 章 激素和生长因子在医疗中的应用 …… 161

7.1 引言 …… 161
7.2 胰岛素 …… 162
7.2.1 糖尿病 …… 162
7.2.2 胰岛素的体内合成 …… 162
7.2.3 常规胰岛素制剂 …… 164
7.2.4 层析法纯化的胰岛素 …… 164
7.2.5 人胰岛素制剂 …… 165
7.2.6 胰岛素配方 …… 167
7.2.7 工程胰岛素 …… 167
7.3 胰高血糖素 …… 167
7.4 促性腺激素 …… 168
7.4.1 促卵泡成熟激素（FSH）、黄体化激素（LH）和人绒毛膜促性腺激素（hCG） …… 168
7.4.2 促卵泡成熟激素（FSH）、黄体化激素（LH）和人绒毛膜促性腺激素（hCG）的来源 …… 169
7.4.3 孕马血清促性腺激素 …… 170
7.4.4 动物的超排卵 …… 170
7.4.5 抑制素 …… 171
7.5 生长激素 …… 171
7.6 促红细胞生成素 …… 173
7.7 其他生长因子 …… 173
7.7.1 血小板源生长因子 …… 174
7.7.2 胰岛素样生长因子 …… 174
7.7.3 表皮生长因子 …… 175
7.7.4 成纤维生长因子 …… 175
7.7.5 转化生长因子 …… 176
7.8 促甲状腺素 …… 176
7.9 促肾上腺皮质激素 …… 177
7.10 泌乳刺激素 …… 177
7.11 多肽调控因子 …… 178
7.11.1 催产素和加压素 …… 178
7.11.2 黄体化激素释放因子 …… 179
7.11.3 生长激素抑制素 …… 179
7.12 进一步的阅读材料 …… 180

第8章 干扰素、白介素和其他调节因子 …… 183
8.1 调节因子——细胞因子和激素 …… 183
8.2 干扰素 …… 184
8.2.1 α干扰素 …… 184
8.2.2 β干扰素 …… 186

8.2.3 γ干扰素 …… 186
8.2.4 α干扰素的生产和医疗应用 …… 186
8.2.5 β干扰素的生产和医疗应用 …… 187
8.2.6 γ干扰素的生产和医疗应用 …… 188
8.2.7 ω干扰素 …… 188
8.2.8 τ干扰素 …… 188
8.3 白介素 …… 189
8.3.1 白介素2 …… 190
8.3.2 白介素2的生产和医疗用途 …… 192
8.3.3 白介素11 …… 193
8.3.4 白介素1 …… 193
8.3.5 白介素4、白介素6和白介素12 …… 194
8.4 肿瘤坏死因子 …… 195
8.4.1 α肿瘤坏死因子 …… 195
8.4.2 α肿瘤坏死因子的生物学效应 …… 196
8.4.3 α肿瘤坏死因子的医疗用途 …… 197
8.4.4 β肿瘤坏死因子 …… 197
8.5 集落刺激因子 …… 197
8.6 细胞因子毒性 …… 199
8.7 进一步的阅读资料 …… 199
第9章 用于分析的蛋白质 …… 202
9.1 引言 …… 202
9.2 用于诊断/分析试剂的酶 …… 203
9.2.1 终点法与动力学方法的比较 …… 205
9.2.2 一些以酶为基础的普通诊断检测 …… 206
9.2.3 血糖分析 …… 207
9.2.4 血中胆固醇和甘油三酯的分析 …… 208
9.2.5 血中尿素和尿酸的分析 …… 209
9.2.6 作为诊断试剂的固定化酶 …… 210
9.3 生物传感器 …… 210
9.3.1 以酶为基础的生物传感器 …… 212
9.3.2 不以酶为基础的生物传感器 …… 213
9.4 作为分析试剂的抗体 …… 214
9.4.1 放射免疫分析 …… 214
9.4.2 酶免疫分析 …… 215
9.4.3 酶联免疫吸附分析 …… 215
9.4.4 在酶免疫分析中使用的酶 …… 218
9.4.5 免疫分析发展的趋势 …… 219
9.4.6 人体免疫缺陷病毒的免疫学分析 …… 219

9.4.7 其他免疫分析应用 …… 222
9.4.8 基于乳胶和其他的免疫分析系统 …… 222
9.4.9 与膜相结合的诊断系统 …… 225
9.5 进一步的阅读材料 …… 227

第 10 章 工业酶概述 …… 229
10.1 工业酶 …… 229
10.1.1 工业酶的商业价值 …… 231
10.1.2 工业酶传统（非重组）来源 …… 231
10.1.3 基因工程对酶生产的影响 …… 232
10.1.4 工程酶 …… 233
10.2 固定化酶 …… 233
10.2.1 凝胶包埋 …… 234
10.2.2 吸附 …… 234
10.2.3 酶的安全性 …… 235
10.2.4 工业酶前景 …… 236
10.3 极端菌 …… 236
10.3.1 嗜热菌 …… 237
10.3.2 由嗜热菌生产的酶 …… 238
10.3.3 其他极端菌生产的酶 …… 239
10.3.4 有机溶剂中催化反应的酶 …… 240
10.4 进一步的阅读材料 …… 241

第 11 章 工业酶——蛋白酶和糖酶 …… 243
11.1 蛋白酶 …… 243
11.1.1 蛋白酶的分类 …… 243
11.1.2 洗涤剂用蛋白酶 …… 245
11.1.3 干酪生产中使用的蛋白酶 …… 247
11.1.4 蛋白酶和肉质嫩化 …… 248
11.1.5 蛋白酶和皮革生产 …… 249
11.1.6 阿斯巴甜的合成 …… 250
11.1.7 酿造与烘制面包工业中使用的蛋白酶 …… 250
11.1.8 蛋白废弃物的酶促转化 …… 251
11.1.9 蛋白酶的其他应用 …… 252
11.2 糖酶 …… 252
11.2.1 淀粉酶 …… 253
11.2.2 淀粉 …… 253
11.2.3 α-淀粉酶 …… 254
11.2.4 葡萄糖淀粉酶 …… 255
11.2.5 β-淀粉酶 …… 256

11.2.6 α1→6 葡萄糖苷酶 …… 257
11.2.7 葡萄糖异构酶 …… 258
11.2.8 淀粉转化的工业价值 …… 259
11.2.9 α-淀粉酶用作洗涤剂 …… 260
11.2.10 α-淀粉酶用于纺织品脱浆 …… 261
11.2.11 乳糖酶和蔗糖酶 …… 262
11.3 木质纤维素降解酶 …… 263
11.3.1 纤维素 …… 263
11.3.2 半纤维素和木质素 …… 264
11.3.3 纤维素酶 …… 265
11.3.4 真菌纤维素酶 …… 265
11.3.5 细菌纤维素酶 …… 266
11.3.6 纤维素酶的结构 …… 266
11.3.7 纤维素水解的工业应用 …… 267
11.3.8 用作洗涤剂 …… 268
11.3.9 砂洗和生物抛光 …… 269
11.3.10 酶催化脱墨 …… 269
11.4 果胶与果胶酶 …… 269
11.4.1 果胶 …… 269
11.4.2 果胶酶 …… 271
11.4.3 果胶及果胶降解酶的工业价值 …… 271
11.5 进一步的阅读材料 …… 272

第 12 章 其他一些工业酶 …… 274
12.1 脂肪酶 …… 274
12.1.1 洗涤剂中的应用 …… 275
12.1.2 其他应用 …… 276
12.2 青霉素酰化酶 …… 277
12.3 酰化氨基酸水解酶和氨基酸的生产 …… 278
12.4 环糊精与环糊精糖基转移酶 …… 280
12.5 酶与动物营养 …… 282
12.5.1 除去不利于营养吸收的因素 …… 282
12.5.2 肌醇六磷酸酶和植酸 …… 283
12.5.3 影响饲料酶功效和稳定性的因素 …… 285
12.5.4 检测加入到饲料中的酶 …… 286
12.5.5 酶与动物营养以及未来发展方向 …… 287
12.6 氧化还原酶 …… 288
12.7 分子生物学用酶 …… 290
12.7.1 限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶 …… 290
12.7.2 DNA 聚合酶 …… 291

12.8 进一步的阅读材料 …… 292

第 13 章 非催化的工业蛋白 …… 294
13.1 引言 …… 294
13.2 蛋白质的功能特性 …… 294
13.2.1 黏度和增稠性 …… 295
13.2.2 凝胶化、内聚力和弹性 …… 295
13.2.3 脂类与香味的结合、乳化和发泡 …… 296
13.3 乳汁和乳蛋白 …… 297
13.3.1 酪蛋白的生化性质 …… 298
13.3.2 酪蛋白的工业生产和应用 …… 300
13.3.3 乳清蛋白的生化性质 …… 304
13.3.4 乳清蛋白的工业化生产和应用 …… 306
13.4 动物蛋白和微生物蛋白 …… 307
13.4.1 明胶 …… 307
13.4.2 卵清蛋白 …… 308
13.4.3 单细胞蛋白 …… 309
13.5 甜味和口味修饰蛋白 …… 310
13.6 进一步的阅读材料 …… 311

索引 …… 313

第1章

蛋白质的结构

1.1 引　言

本书后面的章节旨在探讨与蛋白质来源、纯化、特性和应用相关的问题。在本章这一引言式的章节中，着重于介绍蛋白质的结构。如果对这个主题涉及稍微广泛一点的话，就很容易写成一本这方面的书，而且这方面的文献很多，也很容易得到。本章的目的是提供一个有关这个主题的基本的概述。有兴趣的读者可以求助于本章的“进一步的阅读材料”部分，那里列出了很多本领域的优秀的专门出版物。通过本章提到的网页站点，也可以收集到更多额外的信息。

1.2 蛋白质的结构概述

蛋白质是由一条或几条多肽链组成的大分子（表 1.1）。每一条多肽都是由通过肽（酰胺）键连接的氨基酸组成的链。一条特定多肽的精确的氨基酸序列由编码这条多肽的基因决定。当一个多肽合成之后，这条多肽链就会折叠，呈现一个特定的三维形状（即特定的构象），这个构象对于这条多肽链来说是唯一的。多肽采取的构象取决于其氨基酸序列，并且主要通过大量的弱的相互作用力来实现稳定。任何破坏这种弱作用力的效应（如一定的化学和热）都会导致多肽链的天然构象的破坏，这个过程称为变性。变性常常导致功能活力的降低，这清楚地说明了蛋白质的功能对于蛋白质结构的依赖性。一个蛋白质的结构通常不能单独从其序列预测出来。但是蛋白质的结构信息可以通过实验技术，如 X 射线衍射和核磁共振谱（nuclear magnetic resonance，NMR）测定出来。

多肽链经常被描述为“纤维状”或“球状”。纤维状蛋白采取的是比较简单的三维外形，并且常常是完全拉长的。这类蛋白质在生物体系内起结构/保护性作用（表 1.2）。球状蛋白采取的是比较复杂的三维外形，其中的氨基酸链一般紧密地折叠成一个近似的球形。这种球状蛋白的直径一般是 5～10nm 数量级。蛋白质有时候也分为简单蛋白和结合蛋白两类。简

单蛋白只包括多肽链而不存在其他的化学成分或者没有对生物活性必需的其他化学成分。结合蛋白除了它们的多肽链成分，还包括一个或更多的非肽类组分，这些非肽类组分称为辅基。最常见的与蛋白质有关联的辅基包括碳水化合物（糖蛋白）、磷酸基团（磷酸化蛋白）、维生素衍生物（如黄素蛋白）和金属离子（金属蛋白）。

表 1.1 为一些蛋白质范例，列出了构成蛋白质的多肽链和氨基酸残基的数量，以及它们的分子质量和生物学功能。

表 1.1 精选的蛋白质范例

蛋 白 质	多肽链数量	氨基酸总数	分子质量/u	生物学功能
胰岛素(人)	2	51	5800	很复杂，包括调节血糖水平
溶菌酶(鸡蛋)	1	129	13900	能够降解细菌细胞壁的肽聚糖的酶
白介素 2(人)	1	133	15400	来源于 T 淋巴细胞的多肽，调节免疫性的很多性质
促红细胞生成素(人)	1	166	36000	刺激红细胞增殖的激素
凝乳蛋白酶(牛)	3	241	21600	有助于消化的蛋白质水解酶
枯草杆菌蛋白酶(解淀粉芽孢杆菌)	1	274	27500	细菌枯草杆菌蛋白酶
肿瘤坏死因子(人 TNF-α)	3	471	52000	免疫性和炎症的调节剂
血红蛋白(人)	4	574	64500	气体输运
己糖激酶(酵母)	2	800	102000	对选择的单糖磷酸化的酶
谷氨酰胺脱氢酶(牛)	约 40	约 8300	约 1000000	谷氨酰胺与 α-酮戊二酸及铵离子之间互换的酶

表 1.2 主要的纤维蛋白及其生物学功能

蛋 白 质	功 能
α 角蛋白	头发、体毛、羽毛、指甲和角的主要蛋白质组分
胶原质	结缔组织(如软骨和腱)中的主要蛋白质
弹性蛋白	组成韧带的弹性组织和在动脉壁中发现的弹性结缔组织层
β 角蛋白	构成蜘蛛网和丝的主要结构组分

1.2.1 一级结构

多肽是线性的、没有分支的多聚物，可能包含 20 种不同的单体（即氨基酸），连在一起形成精确的预先确定的序列。多肽链的一级结构指的是其准确的氨基酸序列，连同出现的所有二硫键的准确位置。表 1.3 列出了常见的 20 种氨基酸，以及它们的简写和单字母名称。图 1.1 给出了这些氨基酸的结构。这些氨基酸中的 19 个包含一个中心（α）碳原子，中心碳原子连着一个氢原子（H），一个氨基（$—NH_2$），一个羧基（—COOH）和一个另外的侧链（R）基团，侧链基团的不同区分不同的氨基酸。脯氨酸是一个特别的氨基酸，它的 R 基团与氨基的氮原子形成了直接的共价键（图 1.1），而在其他氨基酸中氨基是自由的。

在后面部分的讨论中可以清楚看到，在邻近的氨基酸残基之间肽键的形成有助于连接在中心（α）碳原子的氨基和羧基之间建立共价连接。因此多肽链中自由的功能（即化学反应性的）基团几乎全部都出现在组成肽链的氨基酸的 R 基团上。这些 R 基团除了决定多肽链的化学反应特性外，还在很大程度上决定了多肽链最终采取的构象。不同的 R 基团的稳定作用力或排斥力（R 基团与 R 基团之间和 R 基团与周围的水介质之间）决定了多肽链最终采取的形态，这在后面将有描述。

表 1.3　20 种常见的氨基酸

R 基团分类	氨　基　酸	缩写名称（三字母）	缩写名称（单字母）	分子质量/u	在“平均”蛋白质中出现的比例/%
非极性，脂肪族	甘氨酸	Gly	G	75	7.2
	丙氨酸	Ala	A	89	8.3
	缬氨酸	Val	V	117	6.6
	亮氨酸	Leu	L	131	9.0
	异亮氨酸	Ile	I	131	5.2
	脯氨酸	Pro	P	115	5.1
芳香族	酪氨酸	Tyr	Y	181	3.2
	苯丙氨酸	Phe	F	165	3.9
	色氨酸	Trp	W	204	1.3
极性但不带电	半胱氨酸	Cys	C	121	1.7
	丝氨酸	Ser	S	105	6.0
	甲硫氨酸	Met	M	149	2.4
	苏氨酸	Thr	T	119	5.8
	天冬酰胺	Asn	N	132	4.4
	谷氨酰胺	Gln	Q	146	4.0
带正电荷	精氨酸	Arg	R	174	5.7
	赖氨酸	Lys	K	146	5.7
	组氨酸	His	H	155	2.2
带负电荷	天冬氨酸	Asp	D	133	5.3
	谷氨酸	Glu	E	147	6.2

注：氨基酸根据侧链结构可以细分为五类。上面也列出了这些氨基酸的三字母和单字母（单字母缩写一般仅用于编辑延续的序列资料时——主要是尽量减少书写空间和书写力气）缩写。另外也给出了它们各自的分子质量及每种氨基酸在“平均”蛋白质中出现的百分率。这个资料是对超过 1000 个不同的蛋白质进行序列分析得到的。

非极性的脂肪族氨基酸（甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和脯氨酸）的 R 基团没有化学反应性质活泼的功能基团。值得注意的是，这样一些 R 基团，即当出现在一个多肽链的主链中时，它们倾向于彼此之间形成非共价的相互作用（通过疏水作用）。这些相互作用对于蛋白质的构象有明显的稳定功能。

甘氨酸应该被关注，因为它的 R 基团是一个氢原子。这意味着甘氨酸的 α 碳原子不是不对称的（即不是一个手性中心）。一个碳原子只有连接 4 个不同的化学基团，才能称为手性中心，对于甘氨酸来讲，连接的 4 个基团中的两个是相同的。因而，甘氨酸没有多重立体异构形式，而不像其他氨基酸都具有 D 型或 L 型两种异构体。在天然的蛋白质中只发现了 L 型氨基酸。

芳香族氨基酸（苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸）的侧链基团并不是化学反应性较强的，但是它们都能够吸收紫外线。特别是酪氨酸和色氨酸在 280nm 有很强的吸收，这样可以通过在这个波长检测吸收值来检测蛋白质和对蛋白质进行定量（第 3 章）。

在 6 个极性但不带电荷的氨基酸中，有两个（半胱氨酸和甲硫氨酸）比较异常，因为它们含有硫原子。甲硫氨酸的侧链是非极性的，尽管它的硫原子容易被氧化，但是它的侧链相对来说是化学惰性的。相反，半胱氨酸 R 基团的硫醇部分（—C—SH）是所有氨基酸侧链中化学反应特性最活泼的。在体内，这个基团可以与各种金属离子形成复合物；它也很容易被氧化，形成由两个半胱氨酸经过共价连接而成的胱氨酸残基（图 1.2）。链内胱氨酸（即

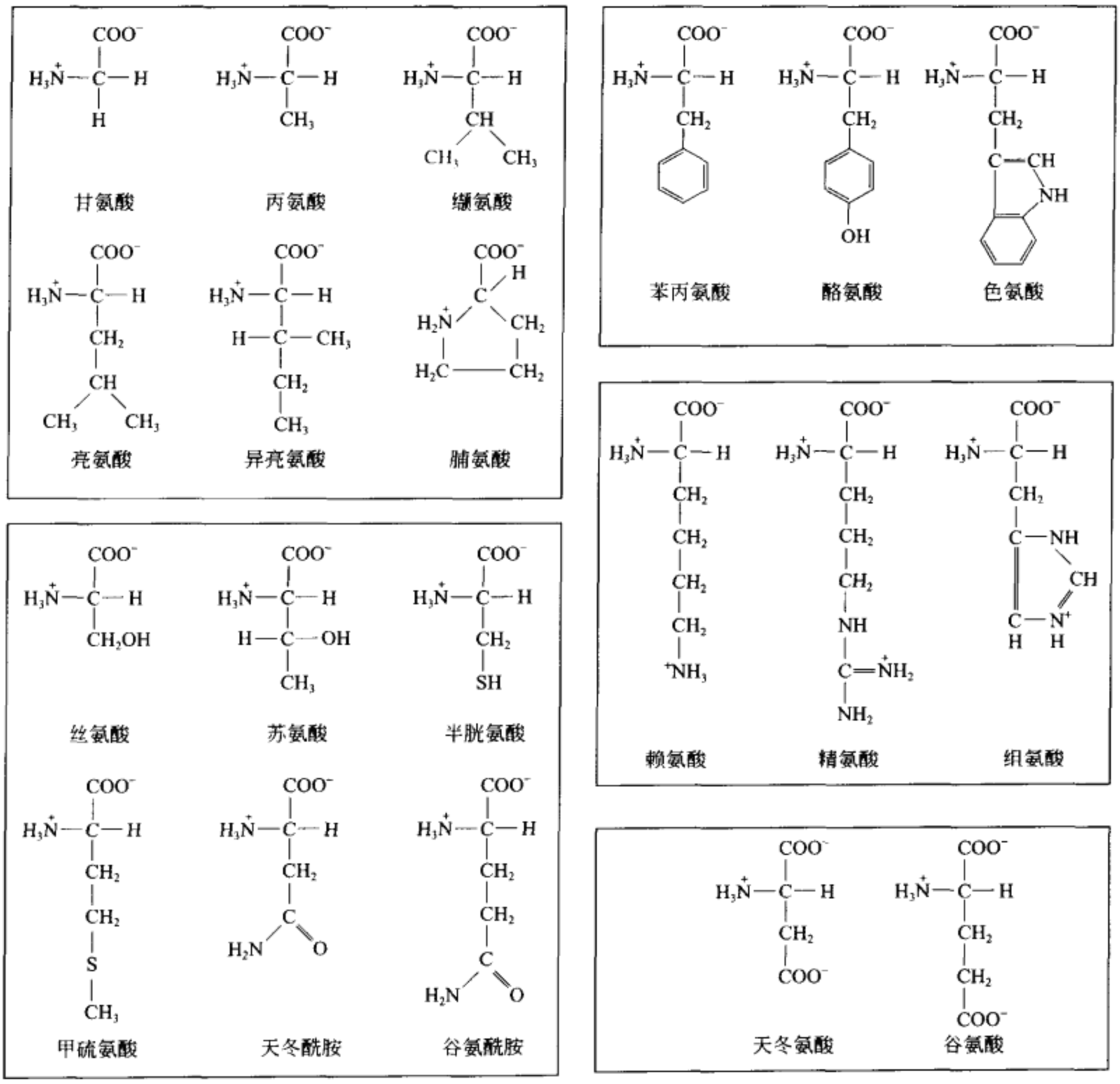


图 1.1 蛋白质中常见的 20 种氨基酸的化学结构

在同一个多肽链主链的两个半胱氨酸之间的二硫键连接）的形成有助于稳定多肽链的三维结构。链间的二硫键连接也可以形成，链间二硫键就是半胱氨酸来自不同的多肽链。链间二硫键是使毗邻的肽链之间形成共价连接非常有效的方法。

在余下的 4 个极性但不带电荷的氨基酸中，两个氨基酸（丝氨酸和苏氨酸）的 R 基团包括羟基（—OH），天冬酰胺和谷氨酰胺的 R 基团则有酰胺基团（$-CONH_2$）。这些氨基酸中没有化学性质特别活泼的，尽管后两者暴露在高温或者极端 pH 下可能脱酰胺化形成天冬氨酸或谷氨酸。

天冬氨酸和谷氨酸在生理条件下本身是带负电荷的。这使它们能够螯合某些金属离子，也能够明显地影响它们所处的多肽链采取的构象。

赖氨酸、精氨酸和组氨酸是带正电荷的氨基酸。赖氨酸的 R 基团包括一个具有 4 个 CH_2 基团疏水的链（图 1.1），链的顶端是一个氨基（$-NH_2$），这个氨基在绝大多数生理状态下是离子化（$-NH_3^+$）的。然而在绝大多数的多肽链中总是有一定数量的未离子化的赖

氨酸，这些未离子化的赖氨酸（不像它们那些离子化的对应物）的化学性质是非常活泼的，这样的赖氨酸侧链可以经过化学反应转化为各种类似物。精氨酸的侧链体积很大，包含了 3 个 CH_2 基团、1 个氨基（$—NH_2$）和 1 个离子化的胍基（$=NH_2^+$）。组氨酸的“咪唑”侧链可以在化学上描述为三级胺（$R_3—N$），因而它可以作为一个强的亲核催化剂（氮原子具有一个孤电子对，使其成为“核质子伴侣”或亲核试剂；它可以将其电子赠予“电子伴侣”或者亲电试剂）。正因为如此，组氨酸的侧链也构成了某些酶的活性部位的重要组成部分（如蛋白酶“枯草杆菌蛋白酶”，第 11 章）。

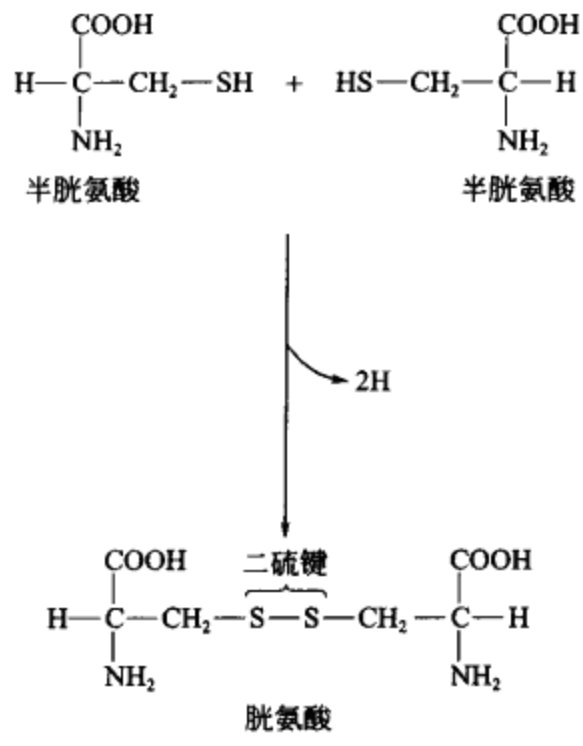


图 1.2　两个半胱氨酸通过形成二硫键而形成胱氨酸

除了 20 种常见的氨基酸外，在很多蛋白质中也发现了修饰的氨基酸。这些氨基酸主要是通过一个翻译后修饰（即修饰是在蛋白质完全合成以后进行的）的反应过程改变的。到目前已经确认了 200 种修饰的氨基酸的特征。比较常见的修饰在本章的后面单独讨论。其他的是一些不常见的修饰。这些修饰包括 4-羟基化的脯氨酸和 5-羟基化的赖氨酸，这些修饰主要在某些纤维蛋白里发现，特别是胶原蛋白里（图 1.3）。羟基化反应发生在内质网中，由（维生素 C 依赖的）羟基化酶催化完成。这些修饰对于保证适当的折叠和成熟纤维蛋白的装配是必须的。γ-羧基谷氨酰胺（Gla）是在某些蛋白质，特别是血液凝固因子中发现的另外一种修饰的氨基酸。负责这些多肽链中的谷氨酰胺侧链羧基化的酶是一个维生素 C 依赖的羧化酶。在内质网中有这种酶。γ-羧基谷氨酰胺结合钙离子非常有效，这对于某些血液因子有效发挥功能是一个必需的过程（见第 5 章）。

修饰的氨基酸的最后一个例子是硒代半胱氨酸（图 1.3）。与刚才介绍的这些实例不同，硒代半胱氨酸不是经过翻译后修饰的途径产生的，它是一个事先就存在的氨基酸（硒代半胱氨酸有时候被称为“21 世纪氨基酸”）。这种形态的硒是某些酶的基本组成部分。编码这些酶的基因的核甘酸序列包含一个“UGA”密码子，这个密码子编码硒代半胱氨酸。在没有硒代半胱氨酸的蛋白质基因里，UGA 一般行使终止密码子的功能。将 UGA 阅读为硒代半胱氨酸而不是更常见的终止密码子，明显地取决于这个密码子两端的核酸序列。同样，有差别的 UGA 的识别可能是 mRNA 构象的一个功能。

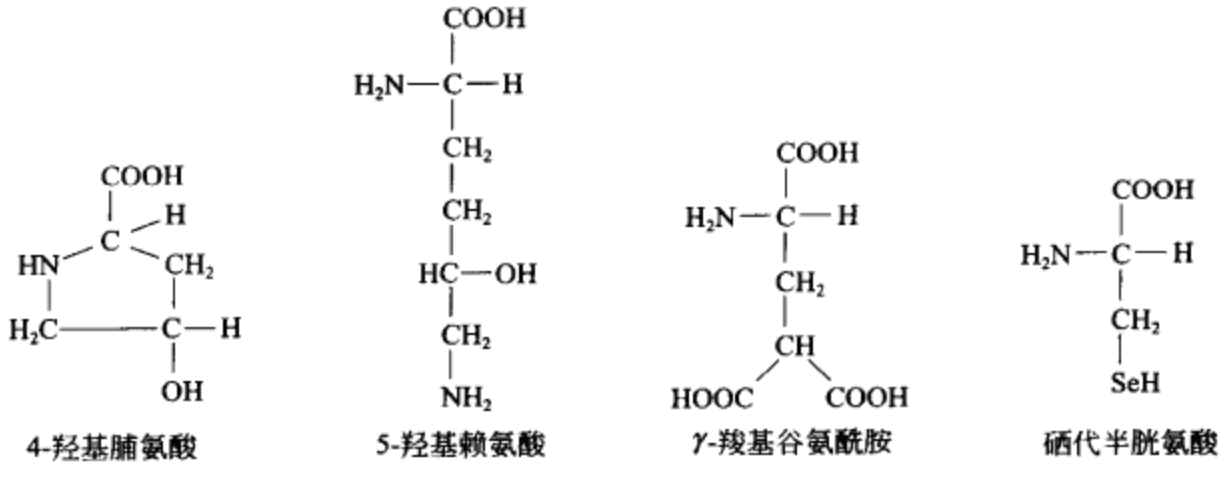


图 1.3　某些修饰的氨基酸的结构

1.2.2 肽键

在蛋白质合成期间，连续不断的氨基酸通过“肽键”（即酰胺键）连接在一起（图 1.4）。这是一个缩合反应，因为在键生成时会脱去一个水分子。每个氨基酸在合成的多肽链中被称为“残基”，多肽链在一端有一个自由氨基（$-NH_2$），在另外一端有一个羧基（—COOH）。这两端分别命名为氨基端和羧基端。

肽键是一个刚性的平面结构，其长度在 0.133nm 范围内。肽键的刚性特点反映了一个事实，即酰胺中的氮原子的孤电子对已经离域化扩散至整个肽键［即键结构是图 1.4（c）说明的两种状态的折中结构］。在绝大多数情况下，肽基团呈现一个“反式”构型［图 1.4（a）］。这样可以最大限度地减少连续的氨基酸残基的 R 基团之间的立体位阻。

虽然肽键是刚性的，但是多肽链主链中出现的另外两个键（即 N—C_α 键和 C_α—C 键，图 1.5）则是可以自由旋转的。多肽链主链可以视为系列平“板”的组合，而且这些平板可以彼此相对旋转。绕着 N—C_α 键旋转的角度称为 ϕ（phi），绕着 C_α—C 键旋转的角度称为 Ψ（psi）（图 1.5）。这些角也被称为旋转角、二面角或扭转角。方便起见，当多肽链处于完全伸展即反式时，这些角定义为 180°。原则上讲，每一个肽键可以旋转为从 −180°～+180°范围内的任意一个角度。但是实际观察到的旋转角度是受限制的，这主要是因为多肽链的主链原子和侧链原子之间有空间位阻。

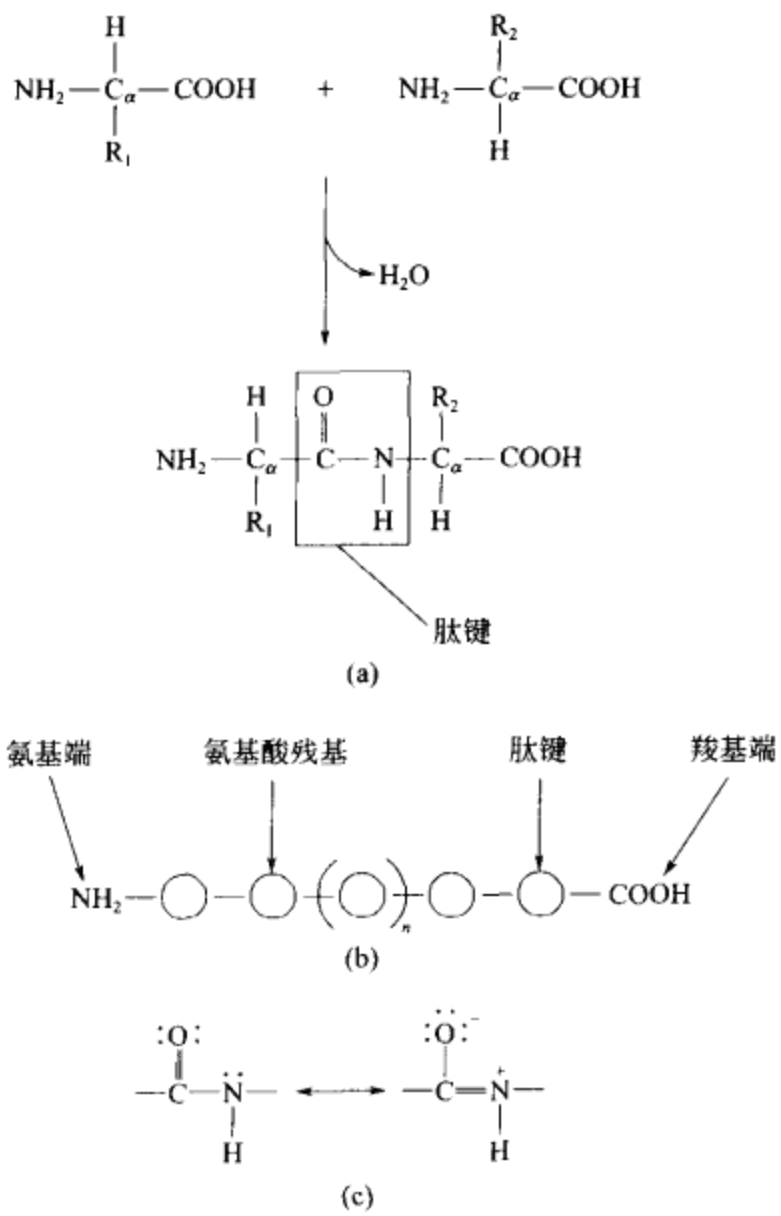


图 1.4

（a）肽键的形成；（b）多肽链由一条通过肽键依次连接的氨基酸线性链组成；（c）肽键显示了部分双键的特征

对于一条多肽链的每一个氨基酸残基来说，物理上可以接受的实际 ϕ 和 Ψ 角可以计算出来，这些成对的角度被用来相互比对对着作图，可以画成一个图，称为 Ramachandran 图。在多数的场合中，立体化学允许的角度落在了一个相对狭窄的范围内。在甘氨酸残基周围经常看到比一般的 ϕ/Ψ 旋转自由度有一个更大的范围，这主要是由于后者有小的 R 基团——因此使立体位阻最小化。相反，因为脯氨酸特殊的结构（图 1.1），在脯氨酸周围的键角自由度有严格限制。在一条多肽链的每一个 C_α 周围允许的 ϕ 和 Ψ 角明显地对多肽链呈现的最终三维形状施加了主要影响。

1.2.3 氨基酸序列测定

多肽链的氨基酸序列可以通过化学测序或通过物理裂解及分析直接测定。肽序列也可以通过测定其对应的结构基因的核酸序列来间接测定。直到 20 世纪 70 年代，直接的

化学测序一直是唯一的方法。胰岛素是采用这种方法测定序列的第一个蛋白质（1953），这花费了几年时间和几百克蛋白质才完成。在后来的数年里，这个方法得到了改进，并实现了自动化，到现在包含 100 个甚至更多氨基酸的多肽链的序列测定可以在几天内自动完成，只需要微克至毫克数量级的蛋白质样品。

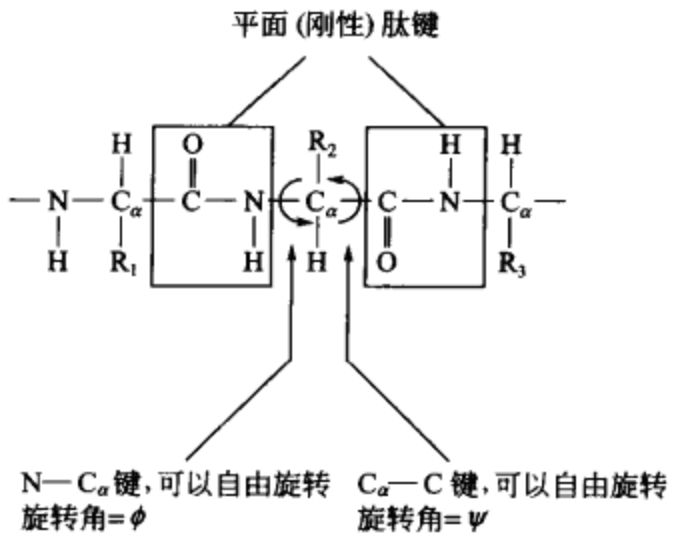


图 1.5
多肽链主链片段图示说明了刚性的肽键和插入的 N—C_α 和 C_α—C 主链连接，这两个主链可以自由旋转

实际采用的化学测序流程称为 Edman 降解。简单地说，它需要从多肽链的 N 端开始，连续地对氨基酸残基进行标记、切除和识别（图 1.6）。多肽链首先与苯异硫氰酸酯（phenylisothiocyanate，PITC）在高 pH 下共同加热，异硫氰苯与多肽链的 N 端氨基基团反应生成苯氨基硫代甲酰胺衍生物（phenylthiocarbamyl，PTC）。随后加入无水三氟乙酸切掉 PTC 衍生物，生成一个噻唑啉酮衍生物（包含 PITC-N 端氨基酸衍生物）和缺少了原来的 N 端氨基酸的多肽链。然后再对噻唑啉酮衍生物进行溶剂萃取，经过介质的酸化使之转化为更稳定的苯乙酰硫脲（phenylthiohydantoin，PTH）衍生物。可以利用层析技术将 PTH-衍生物与标准 PTH-氨基酸进行比较，来确定其中的氨基酸部分的种类。切短的多肽链进入下一个循环以确定原来多肽链的第二个氨基酸。进行更多轮次的循环可以测定多肽链的全部序列。

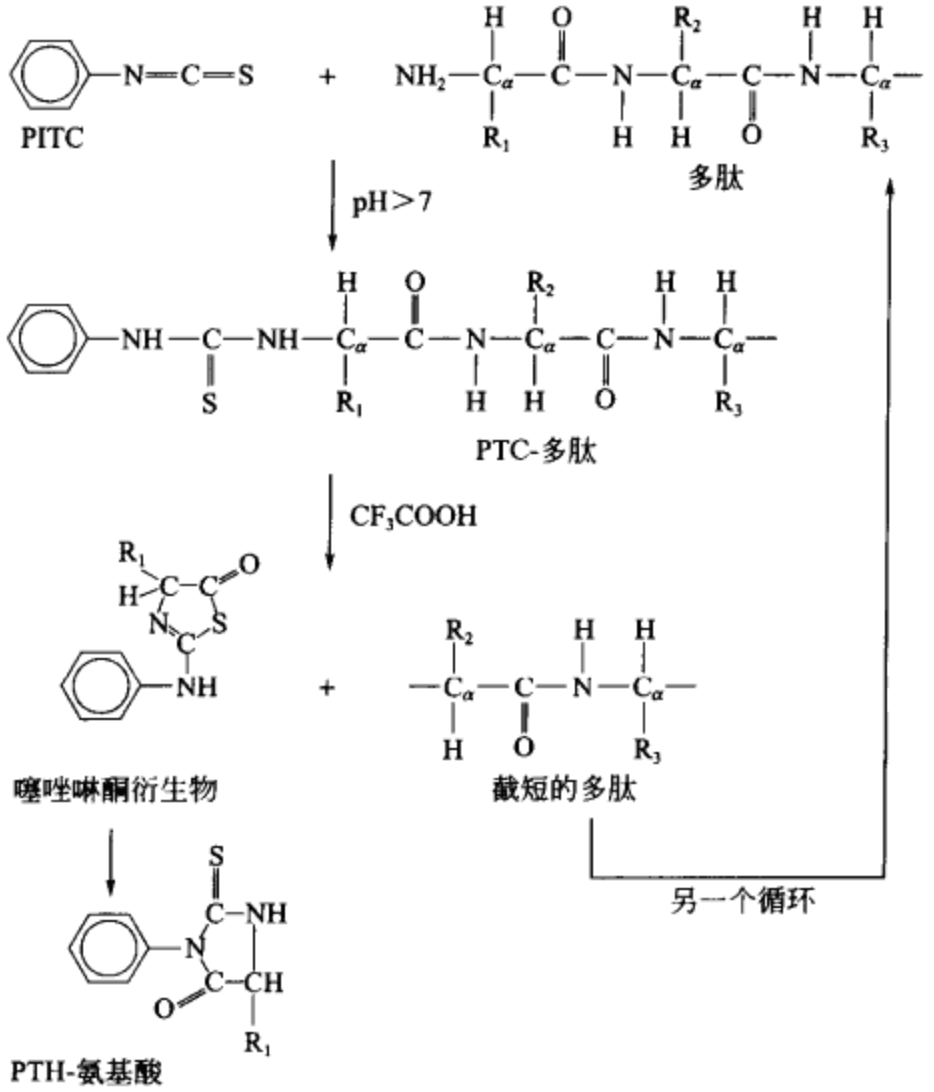


图 1.6　多肽序列分析的 Edman 方法
进一步细节参见正文

在进行 Edman 降解法测序之前，多个肽链的蛋白质的每条多肽链必须分离，然后对每一个多肽链单独测序。另外，所有二硫键连接必须打开，一般通过将蛋白质与合适的还原试剂共同温浴来打开二硫键。

理论上，Edman 降解法可以进行任意大小的蛋白质的序列分析。但实际上在每一个测序循环的重复过程中，都会保留少量的未反应的 N 端氨基酸残基。这种误差会明显地累积，背景“噪声”不断增大，一直会到这样一个程度，即处理的氨基酸不再能够有绝对把握地指认。正因为上面提到的原因，很少有系统能够完全测定含有 100 个或更多氨基酸残基的多肽链的序列。更大一些的多肽链必须降解为更小的肽片段，然后将这些片段分离后独立测序。通过化学或酶技术手段可以实现破碎片段，可以用来水解特定的主链肽键的化学试剂和蛋白水解酶有很多（表 1.4）。然后采用一维或二维电泳分离肽片段，或采用更常用的高效液相色谱（high pressure liquid chromatography，HPLC）来分离。

表 1.4　使多肽链裂解的各种不同的化学和酶试剂

切割的序列	程序或酶
Ala-Yaa	弹性蛋白酶、菠萝蛋白酶
Arg-Yaa	胰蛋白酶、内蛋白酶 Arg-C、梭菌蛋白酶(clostripain)
Asn-Gly	羟胺
Asp-Yaa	V-8 蛋白酶
Asp-Pro	弱酸
Xaa-Asp	Asp-N 蛋白酶
Xaa-Cys	腈基化
Glu-Yaa	V-8 蛋白酶
Gly-Yaa	弹性蛋白酶
Leu-Yaa	胃蛋白酶
Xaa-Leu	嗜热菌蛋白酶
Lys-Yaa	胰蛋白酶、内蛋白酶 Lys -C、菠萝蛋白酶
Met-Yaa	CNBr
Phe-Yaa	胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶
Xaa-Phe	嗜热菌蛋白酶
Pro-Xaa	脯氨酰内肽酶
Trp-Yaa	氧碘代苯甲酸、*N*-氯琥珀酰亚胺、胰凝乳蛋白酶
Tyr-Yaa	胰凝乳蛋白酶、菠萝蛋白酶

注：Xaa 和 Yaa 几乎可以是所有残基（在很多情况下不能是脯氨酸）。残基 Xaa 切割的是 C 端，残基 Yaa 切割的是 N 端。

这些裂解酶通过促进特定主链肽键水解而使多肽链裂解。也列出了每种切割试剂特异靶定的肽键。经 NY Freeman 允许，从 Creighton T（1993），Proteins：Structures and Molecular Properties，2nd edn. 复制。

为了测定肽片段在原来未降解的多肽链中的正确顺序，采用另外的降解试剂对多肽链的新样品进行独立地降解是非常必要的。对产生的新的肽片段组进行分离、测序。旧片段组和新片段组之间重叠序列的识别有助于全序列资料的测定。

测序也可以用来测定一级序列数据中的二硫键连接的定位。在这种情况下，蛋白质的新样品不用事先还原（即打开）任何一个二硫键而直接降解。二硫键的存在会导致产生一个肽混合物，这个混合物中包含着一个大的肽“片段”，这个肽“片段”实际上是两个通过二硫键连接片段组成。分离出这个大的肽“片段”之后，将其还原，它就会释放出两个片段，对释放的两个片段独立测序。这可以查明介入二硫键连接的半胱氨酸分子。

质谱提供了另一种测定多肽链一级序列的手段。质谱的应用在第 3 章的结尾讨论。

另外一个进行蛋白质氨基酸序列测定的手段是对其结构基因/cDNA 进行测序。可以从获得的核酸序列推导出氨基酸序列。DNA 测序的方法学和仪器的进展使序列分析变得快速而且价格低廉。近些年来，越来越受重视。写作时正在进行的基因组计划将不断产生大量序列资料。到 2000 年底，大约 273 个物种的主要或全部序列资料都可以得到（表 1.5）。结果，大量的假想蛋白质的序列得到了测定，尽管其中绝大多数的结构和功能还不知道。

产生了序列信息之后，序列信息一般提交给各种数据库。可以看到蛋白质初级序列信息的主要数据库在表 1.6 中列出。主要的核酸序列数据库也包括在表 1.6 中，因为氨基酸序列可能从这些数据库推导出来。

表 1.5　已经测定或即将完全/几乎完全测定基因组序列的代表物种

生　物　体	分　类	基因组大小/Mb	生　物　体	分　类	基因组大小/Mb
敏捷气热菌	古细菌	1.67	梅毒密螺旋体	真细菌	1.14
闪烁古生球菌	古细菌	2.18	霍乱弧菌	真细菌	4.0
热球菌属	古细菌	1.80	构巢曲霉菌	真菌	31.0
热球菌属	古细菌	2.10	白色假丝酵母	真菌	15.0
硫磺矿硫化叶菌	古细菌	2.99	链胞菌	真菌	47.0
嗜酸热原体	古细菌	1.56	裂殖酵母菌	真菌	14.0
产液菌属(极嗜热)	真细菌	1.50	牛巴贝虫	原生动物	未列出
枯草杆菌	真细菌	4.20	小隐孢子虫	原生动物	10.4
炭疽热杆菌	真细菌	4.50	大型利什曼虫	原生动物	33.6
百日咳博德特菌	真细菌	3.88	拟南芥菜	植物	70.0
猪布鲁菌	真细菌	3.30	大麦	植物	5.0
沙眼衣原体	真细菌	1.23	棉花	植物	未列出
破伤风梭状菌	真细菌	4.40	小麦	植物	未列出
白喉棒状杆菌	真细菌	3.10	玉米	植物	未列出
大肠埃希菌	真细菌	5.23	斑马鱼	鱼	未列出
嗜酸乳酸菌	真细菌	1.90	原鸡	鸟	未列出
单核细胞增生利斯特菌	真细菌	2.94	牛	哺乳动物	未列出
麻风分枝杆菌	真细菌	2.80	狗	哺乳动物	未列出
结核分枝杆菌	真细菌	4.40	褐家鼠	哺乳动物	未列出
脑膜炎奈瑟球菌	真细菌	2.18	绵羊	哺乳动物	未列出
铜绿假单胞菌	真细菌	6.3	猪	哺乳动物	未列出
肠沙门菌	真细菌	NL	猿	灵长类动物	未列出
金黄色葡萄球菌	真细菌	2.80	人	灵长类动物	未列出
肺炎链球菌	真细菌	2.04			

注：数据主要来自 http://wit.integratedgenomics.com/GOLD/eucaryoticgenomes.html 和 http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdcomplete.html。这些站点的信息可以更新。

表 1.6　主要的一级序列（蛋白质和核酸）数据库以及访问它们的网址

数　据　库	网　址
蛋白质	
PIR	http://www-nbrf.georgetown.edu/
Swiss-Prot	http://www-ebi.ac.uk/swissprot/
MIPS	http://www-mips.biochem.mpg.de/
NRL-3D	http://www-nbrf.georetown.edu/pirwww/dbinfo/nrl3d.html
Tr EMBL	http://www-ebi.ac.uk/index.html
Owl	http://www-bis.med.jhmi.edu/Dan/proteins/owl.html
核酸	
EMBL	http://www-ebi.ac.uk/embl/index.html/
GenBank	http://www-ncbi.nlm.nih.gov
DDBJ	http://www-ddbj.nig.ac.jp/

General information about the entry	
Entry name	INS_HUMAN
Primary accession number	P01308
Secondary accession number(s)	None
Entered in SWISS-PROT in	Release 01, July 1986
Sequence was last modified in	Release 01, July 1986
Annotations were last modified in	Release 39, May 2000
Name and origin of the protein	
Protein name	INSULIN[Precursor]
Synonym(s)	None
Gene name(s)	INS
From	*Homo sapiens* (*Human*) [TaxID: *9606*]
Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

Features

SIGNAL	1	24	
CHAIN	25	54	INSULTN B CHAIN.
PROPEP	57	87	C PEPTIDE.
CHAIN	90	110	INSULIN A CHAIN.
DISULFID	31	96	INTERCHATN.
DISULFID	43	109	INTERCHATN.
DISULFID	95	100	
VARIANT	34	34	H ⟶D(IN PROVIDENCE; FAMILIAL HYPERPRO INSULINEMIA). /FTID = VAR_003971.
VARIANT	48	48	F ⟶S(IN LOS-ANGELES; TYPE-II DIABETES MELLITUS). /FTID = VAR_003972.
VARIANT	49	49	F ⟶L(IN CHICAGO). /FTID = VAR_003973.
VARIANT	89	89	R ⟶H(IN FAMILTAL HYPERPRO INSULINEMIA; IMPAIRS POSTTRANSLATIONAL CLEAVAGE). /FTID = VAR_003974.
VARIANT	89	89	R ⟶L(IN KYOTO; FAMILTAL HYPERPRO INSULINEMIA). /FTID = VAR_003975.
VARIANT	92	92	V ⟶L(IN WAKAYAMA). /FTID = VAR_003976.
TURN	32	32	
HELIX	33	46	
STRAND	48	50	
HELIX	91	95	
TURN	96	97	
HELIX	102	108	
STRAND	109	109	

Feature table viewer

Sequence information

Length: 110 AA[This is the length of the unprocessed precursor]	Molecular weight: 11981 Da [This is the Mw of the unprocessed precursor]	CR C64; C2C3B23B85F520E5[This is a checksum on the sequence]

```
        10         20         30         40         50         60
         |          |          |          |          |          |
MALWMRLLPL LALLALWGPD PAAAFVNQHL CGSHLVEALY LVCGERGFFY TPKTRREAED

        70         80         90        100        110
         |          |          |          |          |          |  P01308 in
LQVGQVELGG GPGAGSLQPL ALEGSLQKRG IVEQCCTSIC SLYQLENYCN            FASTA format
```

图 1.7 Swiss-Prot 数据库中呈现的人胰岛素样品条目

进一步细节参见正文。这个 Swiss-Prot 条目是有版权的。它是由瑞士生物信息学研究所和 EMBL 分部欧洲生物信息学研究所协作完成。只要它的内容不修改和声明不撤去，它对于非赢利机构的使用没有任何限制

Swiss-Prot 数据库可能是应用最广泛的蛋白质数据库。它由欧洲生物信息学研究所（EBI）和瑞士生物信息学研究所合作维持。通过国际互联网（表 1.6）就可以访问和搜索。图 1.7 提供了人胰岛素的一个简化条目。详述这些数据库的另外信息可以通过表 1.6 提供的互联网地址和本章结尾列出的生物信息学出版物得到。

一个多肽的氨基酸序列可以通过直接的化学手段（Edman）或物理方法（质谱）得到，也可以间接通过基因测序来得到。在实践中，这些方法互为补充，可以被用于交叉检查序列的准确度。如果目标基因或 mRNA 已经首先分离，那么 DNA 测序就是最方便的。但是这种方法不能反映有关出现在成熟多肽中的翻译后修饰的任何信息。相反，直接的测序方法可以反映出这种翻译后修饰。如果目标多肽的基因或 mRNA 没有分离出来，直接对多肽测序是唯一可行的选择。即使只得到部分序列信息都可以帮助设计寡核苷酸探针，以此用来分离或克隆多肽的基因。

1.2.4　多肽合成

对多肽的特征进行全方位鉴定常常需要适量甚至大量（毫克或克）纯净的目标多肽。如果多肽有商业用途的话，甚至需要更大的量。在某些情况下，一些多肽可以从自然界的来源物中直接大量提取以获得足够的量。然而，在多肽链的氨基酸序列（和它所有的翻译后修饰）阐明后，多肽链也可以通过直接化学合成来制造。合成可以通过化学手段或通过生物路线（重组 RNA 技术）。在第 2 章将讨论这两种方法。

1.3　高级结构

到目前为止，讨论主要集中在蛋白质分子的一级结构（氨基酸序列）上。蛋白质的高级结构可以在不同的层次描述，即二级结构、三级结构和四级结构。

① 二级结构可以被描述为一条多肽链的主链的局部的空间构象，排除了组成肽链的氨基酸的侧链。主要的二级结构单元是 α 螺旋和 β 折叠，详情见下面的描述。

② 三级结构指的是组成多肽链的所有原子的三维排列。

③ 四级结构指的是一个由两条或多条多肽链组成的蛋白质内部的肽链亚基之间的总体空间排列。

1.3.1　二级结构

通过研究大多数蛋白质的主链，常常可以明显看到一些规则的、重复形状的氨基酸片段。最常见的二级结构单元称为 α 螺旋和 β 折叠股。纤维蛋白一般只有一种类型的二级结构，从多肽链的一端延伸到肽链的另一端。例如，一种纤维蛋白 α 角蛋白的全部主链都采取了 α 螺旋状态，而另外一种纤维蛋白，蚕丝蛋白则呈现 β 构象。相反，球蛋白的主链构象则一般包含多个规则的二级结构片段（α 螺旋或 β 折叠），以及一些分割二级结构的、没有规则的及重复构象的片段。α 螺旋和 β 折叠是最常见的形状，因为它们可以最大限度地形成稳定分子的分子内氢键，而且能够最大限度减少邻近的侧链基团的空间排斥，这与肽键的刚性

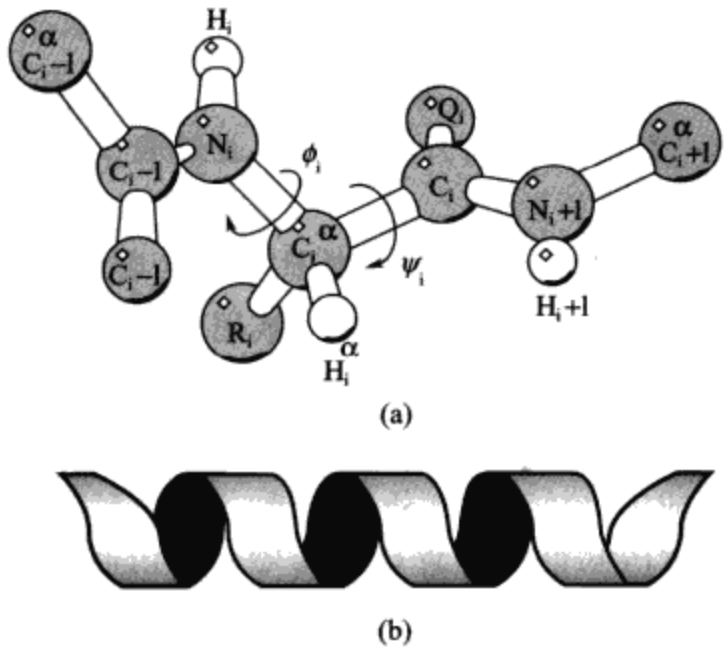


图 1.8 一个 α 螺旋片段的球棍模型（a）和飘带模型（b）

经过 Chichester 市的出版者 John Wiley & Sons 的友好的允许，从“Current Protocols in Protein Science”一书上复制

平面特性是一致的。

α 螺旋是右手螺旋，每一个整圈包含 3.6 个氨基酸残基（见图 1.8）。这大致相当于一个沿着螺旋的长轴 0.56nm 的长度。形成螺旋的氨基酸残基的侧链都从螺旋的主链向外伸出。最有益于形成 α 螺旋的氨基酸有丙氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和谷氨酰胺。脯氨酸以及出现多个靠得很近的、体积大的侧链基团的或者带相同电荷的残基会阻碍 α 螺旋的形成。α 螺旋是通过氢键来稳定的，每一个主链的 C═O 基团与位于螺旋中在该残基前面的第四个残基的 N—H 基团形成了氢键。在球状多肽中发现的 α 螺旋片段在长度分布上有很大的不同，变化范围从一圈螺旋到超过 10 圈连续螺旋。螺旋的平均长度是三圈。

在球蛋白中，α 螺旋最普遍的出现位置是蛋白质分子的表面，同时螺旋的一个侧面对着疏水内核，螺旋的另外一面对着周围的水介质。这类螺旋的氨基酸序列具有这样一种特征，即疏水氨基酸残基位于螺旋的一个侧面，同时疏水残基彼此排成一行。对于那些横跨生物膜的多肽来讲，其跨膜部分一般是一个（或多个）α 螺旋片段。在这样的情况下，在螺旋中发现的几乎所有残基都有疏水侧链。

β 折叠股描绘了蛋白质中另外一种主要的重复结构单元。β 折叠股的长度一般是 5 到 10 个氨基酸，残基采取了一种几乎完全伸展的之字型转弯构象。单条的 β 折叠股很少见到或几乎不会见到。相反两条或更多条 β 折叠股会排在一起，形成一个 β 折叠片。β 折叠片是一个常见的由最多的氢键稳定的结构单元（图 1.9）。参与形成一个 β 折叠片的不同折叠股可能是在同一个多肽链内，也可能出现在两个邻近的多肽链上。β 折叠片可以描述为平行、反平行以及混合型。当形成 β 折叠片的所有折叠股是以相同的方向（即从氨基端到羧基端，图 1.9）连接，则形成的是平行折叠片。当连续的折叠股具有不同的方向（即从 N 端到 C 端的股连接从 C 端到 N 端的股等）时就形成了一个反平行折叠片。一个包含平行和反平行的股的 β 折叠片称为混合型折叠片。

在二级结构方面，很多蛋白质由多个 α 螺旋和 β 折叠片段组成，这些二级结构被各式各样的环区所分割。这些环区的长度和形状多种多样，这样使整个多肽链能够折叠成一个致密的三维结构。一般而言，环区都位于多肽链的表面。它们富含极性/带电荷的氨基酸残基，连同它们的那些与肽键和与表面的水分子形成氢键所关联的 N—H 和 C═O 基团。环区经常具有较大的柔性，更长的环区容易被蛋白水解酶切割。环区除了在连接规则的二级结构单元这方面具有明显的作用外，它们经常参与或直接贡献于蛋白质的生物学功能。例如，抗体的抗原结合区域主要由 6 个环区构成。这些环区也经常组成酶的活性中心。

有一种命名为 β 回转（turn）或 β 弯曲（bend）的环区的结构是不同寻常的，它是很多蛋白质的特征性质。β 弯曲导致主链的方向沿着 4 个氨基酸残基的路线有一个 180°的改变，在两个反平行的 β 折叠股之间最容易找到这种结构（图 1.10）。甘氨酸和脯氨酸残基经常出

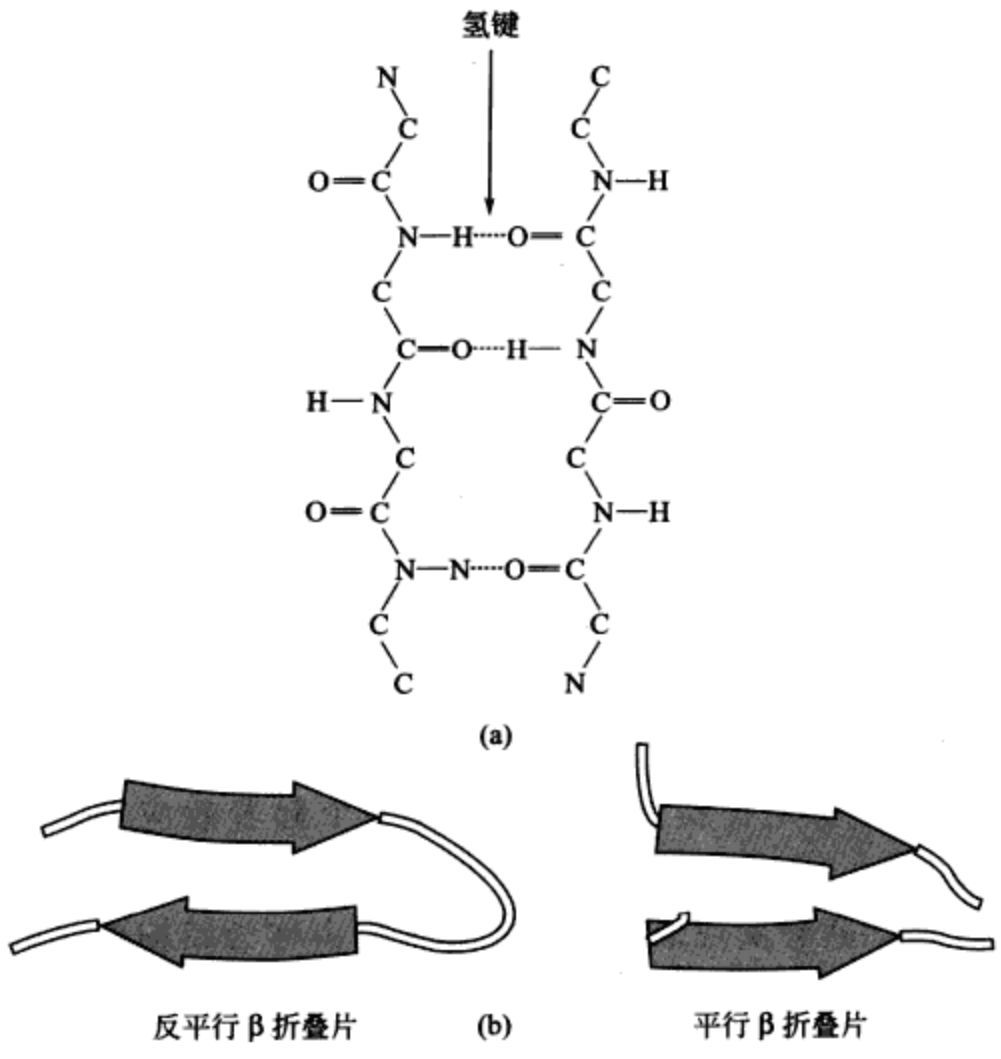


图 1.9　β 折叠片

(a) 显示了通过氢键形成 β 折叠片的 β 折叠股（反平行）的两个片段。β 折叠股划成粗箭头来表示。为方便起见，箭头的方向指的是多肽 C 端的方向。(b) 以平行和反平行模式形成的双股 β 折叠片的图示说明

现在 β 回转中。甘氨酸由于其侧链小，能够最大限度地减少空间位阻。脯氨酸由于其独特的结构所具有的特点，能够自然地在多肽链主链中引入扭结或弯曲。稳定环区的部分因素是第 1 个残基的 C═O 基团和第 4 个残基的 N—H 基团形成了氢键（图 1.10）。

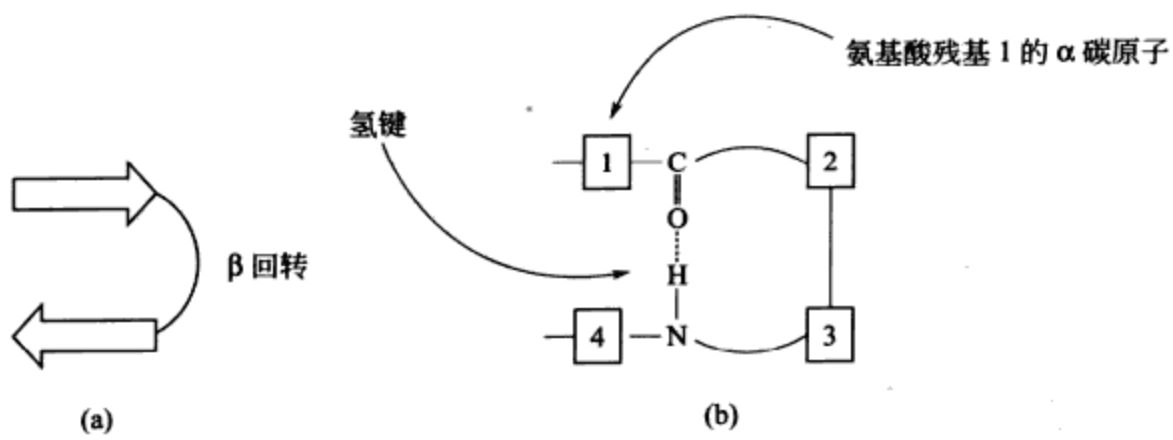


图 1.10

(a) 经常在两个反平行的 β 折叠片段之间发现的 β 回转或 β 弯曲。(b) 这个结构的稳定部分是因为在 C═O 键和位于回折颈部肽键的 NH 基团之间形成了氢键

1.3.2　三级结构

正如前面提到的那样，一个蛋白质的三级结构指的是与多肽链的所有组成原子对于其他

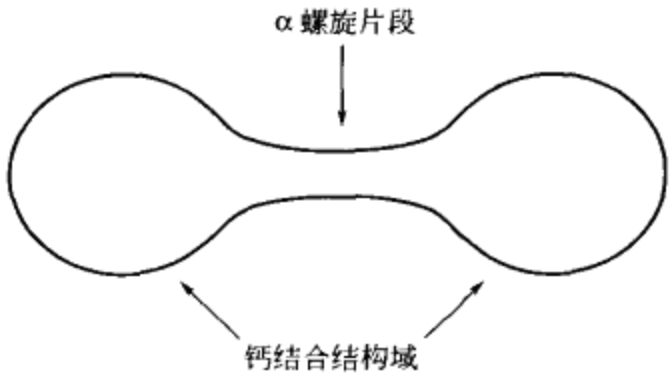


图 1.11　多肽肌钙蛋白 C 的示意图

其功能是肌肉中的钙结合蛋白。它由两个紧密堆积的结构域组成（每个结构域都可以结合钙），这两个结构域被一个扩展的 α 螺旋片段分割

原子的空间相对定位有关联的精确的三维结构。较小的蛋白质（大约 200 个或更少氨基酸残基）的三级结构经常形成一个单独的不连续的结构单元。然而，当考察很多更大的蛋白质的三维结构时，在多肽内出现两个或更多个结构亚单元就会变得显而易见。这些结构亚单元被命名为结构域。结构域就是一条多肽链中常常紧密折叠的部分，结构域之间由具有柔韧性和扩展的区域连接（图 1.11）。同时因为在结构上是截然分明的，因而结构域也常常是独立的功能单元。例如，肌钙蛋白 C 的两个结构域都对结合钙离子有贡献（图 1.11），细胞表面受体常常包括一个或多个胞外结构域（其中部分或全部参与了配体结合），一个跨膜结构域（在本性上是疏水的，主要作用是把蛋白质稳定在膜上）和一个或多个起着效应器功能的细胞内结构域（如产生二级信号）。

如果深入研究的话，就会发现结构域本身也常常由称为结构模体的“积木块”组成。结构模体（有时候也被称为超二级结构）由一些二级结构片段（即 α 螺旋或 β 折叠股片段）通过环区连接而成，所有的片段都排列在一个特定的三维构象中。任何一个给定的结构模体都常常会在各种不同的蛋白质中找到，这些蛋白质的生物功能可能是相关的，也可能是不相关的。比较普遍出现的结构模体包括螺旋束、β 发夹、希腊钥匙模体、果冻圈、β 夹心和 β 桶（图 1.12）。

螺旋束这个术语指的是包含几个由短的弯曲或回环分割的 α 螺旋片段组成的结构模体。α 螺旋单元相互之间常常（尽管不是总是）几乎全部都是平行或反平行的。螺旋束的轴有时候是扭曲的，因而使整个螺旋束看起来都是扭曲的。组成螺旋束的螺旋片段数量可以不同。例如，很多造血细胞因子都是四螺旋束，而细胞色素 c 氧化酶则是 22 螺旋束。

β 发夹模体（又称为 β 带或 β-β 单元）是一个简单的结构模体，它仅由两个通过回环连接的 β 二级结构片段组成。合成的 β 折叠片的轴常常是扭曲的（图 1.12）。很多不同的多肽类型中都会找到发夹模体。希腊钥匙模体在很多蛋白质中也经常出现，这个特征结构由四个紧邻的反平行折叠股折叠而成（图 1.12）。果冻卷模体实际上是由两个紧密相关的希腊钥匙模体组成（图 1.12）。在这个例子中，折叠股 1、2、7 和 8 组成了第一个希腊钥匙模体，而折叠股 3、4、5 和 6 组成了另外一个希腊钥匙模体。大体来说，它形成了一个几乎完全封闭的桶形状。

正像它的名字暗示的那样，β 三明治结构模体由两个彼此面对面堆积的 β 折叠片组成。在某些蛋白质中也发现了这种三明治结构的变种。例如，αβα 三明治由一个紧紧堆积在两个 α 螺旋片段中的 β 折叠片组成。这种模体类型经常与核苷酸结合蛋白有关。

β 桶也是另外一种经常在很多蛋白质中发现的模体类型。它是一些被环区分割开的 β 折叠股片段的装配，折叠股形成一个桶样的结构。根据蛋白质性质的不同，“桶”可以由从 5 个到 16 个之间的任意个 β 折叠股组成。这个结构的一个变种是 α/β 桶，正像名字暗示的那样，它是一个由交互的 α 螺旋和 β 折叠片段组成的桶样模体。

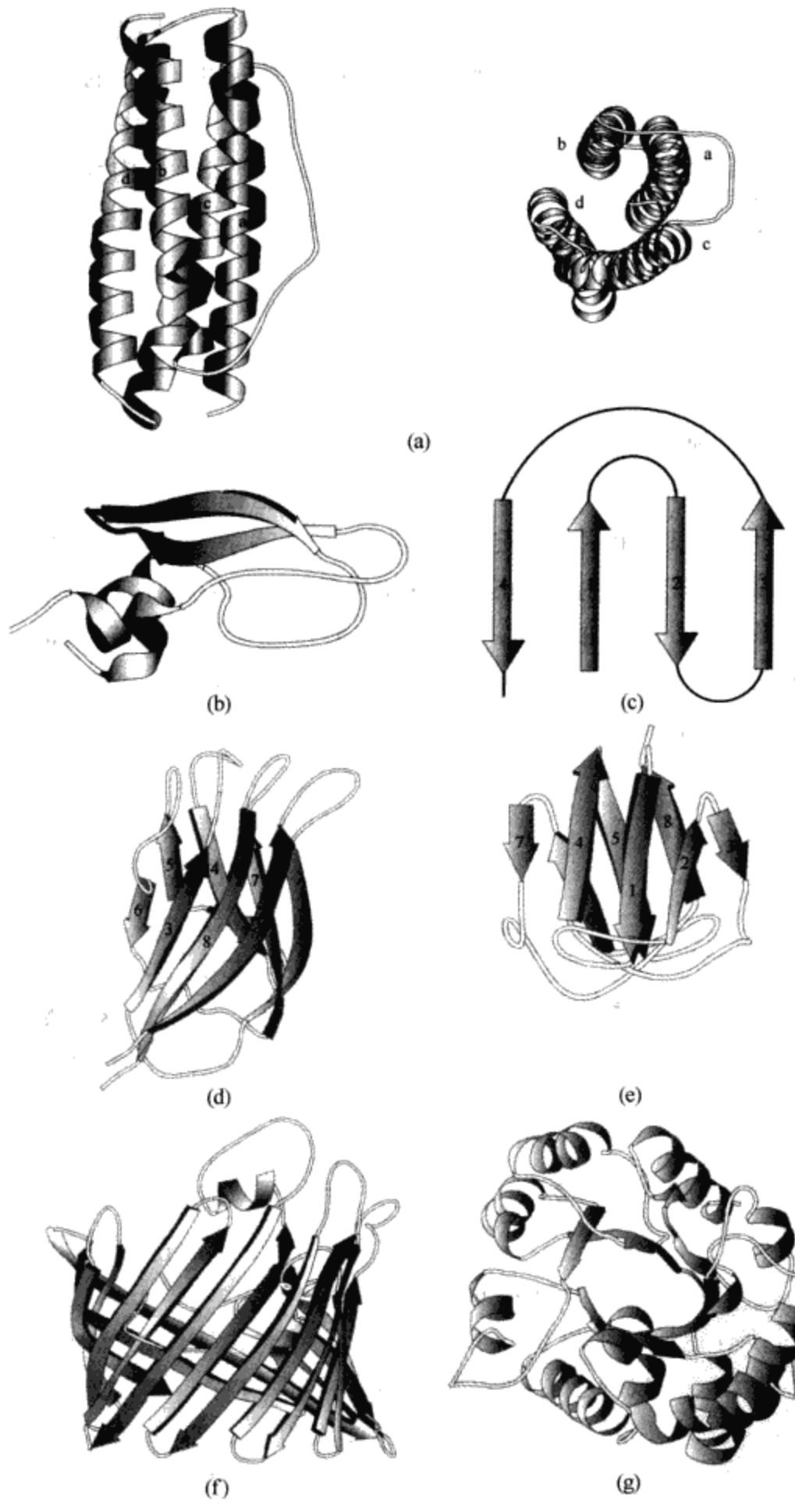


图 1.12　某些在球状多肽中经常出现的结构模体

(a) 四螺旋束；(b) 发夹结构；(c) 具有希腊钥匙拓扑结构的β折叠片；(d) 果冻卷结构模体；(e) β三明治结构；(f) β桶结构；(g) α/β桶结构。更进一步的细节参见正文。经过 Chichester 市的出版者 John Wiley & Sons 出版公司的友好允许，从“Current Protocols in Protein Science”一书上复制

多肽常常根据其生物活性/功能来描述其特征（如酶、抗体等）。以多肽结构域结构为基础可以做出另外一种分类方法。在这种基础上，多肽结构域一般是下面三种类型中的一种：α结构域、α/β结构域和β结构域。在α结构域的情况下，这种结构域的核心结构专一地由α螺旋片段组成。形成这种结构域最常见的单个的模体是四螺旋束结构。α/β结构域结构由β-α-β模体的组合构成，这个模体形成了由α螺旋片段包围的平行β折叠片。这是在蛋白质中发现的最普遍的结构域类型。β结构域结构呈现一个由反平行β折叠片构成的核。这个结构域常常出现两个折叠片，彼此堆积在一起，形成一个扭曲的桶样结构。

1.3.3 高级结构测定

有三种可能显示蛋白质三维结构的方法：X射线衍射、核磁共振（NMR）和电子显微镜方法。后者只能显示低分辨率的结构信息，只能提供很少或几乎提供不了原子的细节。它主要用于获得很大的蛋白质分子（多个多肽链）的粗略的三维形状，或者病毒衣壳的蛋白质聚集状态。X射线衍射和NMR是最常用的获得高分辨率蛋白质结构的技术。尽管近年来在可以采用的分析设备和相关的计算能力两方面的进展都使得这些技术更适宜于分析多肽/蛋白质的结构，但是这些方法的成功应用迄今只探明了很少数量的蛋白质的完全三维结构。下面给出了这些方法的主要概述，在本章的最后列了一些合适的更深的读物。

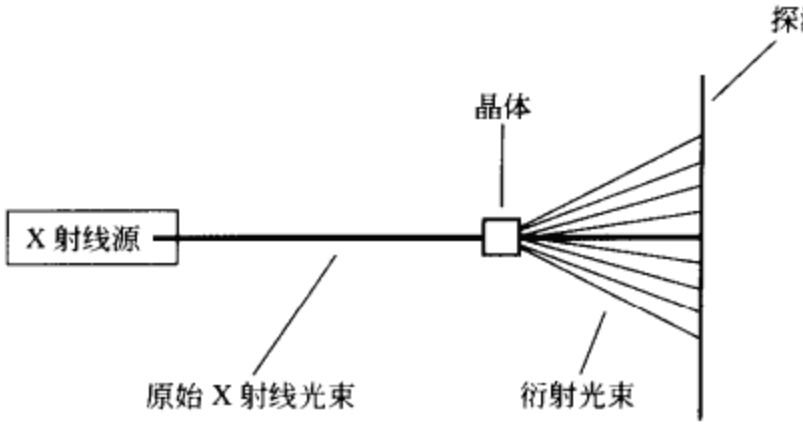


图 1.13 X射线衍射原理的概述
细节参见正文

任何结构，只有当电磁辐射的波长与该结构的线度可以比较时，这个结构才可以被显示出来。对于蛋白质的情况，合适的大小是埃（10^{-10} m）数量级。X射线的波长接近这个数量级，因此可以采用X射线衍射技术。X射线衍射需要用一束X射线轰击晶体形态的蛋白质样品（图1.13）。大多数X射线直接通过了晶体，但也有一部分射线被晶体衍射。衍射得到的衍射花样可以记录在探测仪上，衍射花样反映了处于晶体中的蛋白质分子的三维结构。

蛋白质X射线衍射第一步必须做的事情是制备蛋白质的晶体。虽然很多小分子量的物质比较容易结晶，但对于大多数球蛋白来讲情况却并不是这样。这些球蛋白分子特别巨大，而且表面很不规则。即使让蛋白质结晶，蛋白质晶体里也会含有很多介于单个分子之间、充满溶剂的通道或孔洞。溶剂（一般是水）大致占据了晶体体积的30%～80%。蛋白质分子之间作用的界面只是蛋白质表面的很小一部分比例，这样导致一个结果，就是蛋白质晶体是松软的，而且容易被毁坏。

为了得到蛋白质晶体，可以采取很多措施。一般来说，为了成功制备蛋白质晶体，蛋白质必须非常纯。当蛋白质从过饱和的溶液中非常缓慢地沉淀时就可能形成蛋白质的晶体，这可以通过气相扩散或透析来实现。气相扩散是最常用的方法，它可以使蛋白质分子在包含适当沉淀剂如聚乙二醇（Polyethylene glycol，PEG；见图1.14）的溶液慢慢浓缩。其他因素

如溶液 pH、溶液的缓冲系统、金属离子、低分子量有机分子等也对结晶有很大影响。理想的结晶条件要由直接的实验来决定。适合用于 X 射线衍射的晶体，其线度至少要达到 50μm，对于某些老式的 X 射线衍射仪器来说需要更大的晶体（500μm）。这样的晶体中包含了多达 10^{16} 个蛋白质分子。

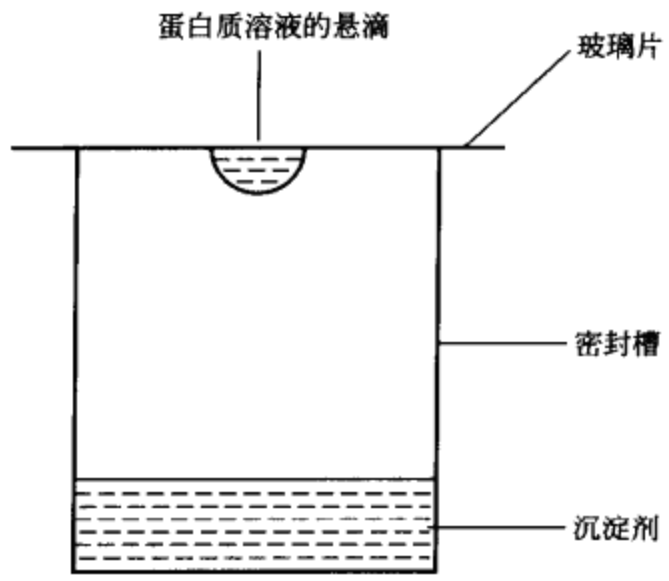


图 1.14　气相（悬滴）扩散法得到的蛋白质晶体的生长

将一小滴浓缩的含有适当的沉淀剂（如聚乙二醇或硫酸铵）的纯净蛋白质的溶液放在玻璃片表面。然后将玻璃片翻转过来，密封（如真空油脂）在一个含有沉淀剂池液的小槽顶部。将这套设备放在 22℃ 的温度环境中培养，这样会使包含蛋白质的液滴中的水分慢慢扩散。慢慢地就会形成蛋白质的过饱和溶液，这就有助于晶体生长

一个金属板被高速电子轰击时就会产生 X 射线。这常常在高压管中来实现，但更强的 X 射线光束可以在同步加速器储藏环中产生，其中使用的电子以接近光速的速度运行。X 射线光束从其源头处经过一个窄窗口溢出，然后经过蛋白质晶体（见图 1.13）。衍射斑点记录在一个信号板上，然后对衍射斑点进行扫描，把衍射花样储存在计算机中。然后利用傅里叶变换的数学公式可以分析衍射花样中的信息。这可以得到一些与蛋白质分子中的原子相对定位有关系的信息。出于很多技术的原因，从蛋白质晶体母体得到的 X 射线数据必须与由蛋白质的不同原子与重金属原子复合形成的复合物晶体的衍射数据进行比较。可以将金属离子慢慢扩散到预先结晶好的蛋白质晶体中的通道或者孔洞中来实现这个目的。这些金属离子会跟蛋白质的氨基酸侧链基团（如半胱氨酸的巯基）反应。

利用 X 射线方法测定蛋白质结构的一个主要瓶颈就是在使大多数蛋白质结晶时遇到的困难。NMR 可以用于测定溶液状态的蛋白质的结构。但是由于这项技术尤其是数据收集方面的复杂性，使这种方法的使用仅限于相对较小的蛋白质分子（一般是 25ku 或更小）的结构测定。当然这个领域技术的进展也很有可能使 60～80ku 的蛋白质达到切实可用的分辨率。

NMR 分析必须对感兴趣的蛋白质样品使用一个强磁场。然后应用射频的电磁辐射。NMR 分析基于这样一个事实，一定数量的原子核呈现磁运动。这些核包括 ^{1}H、^{13}C、^{15}N 和 ^{31}P。这主要是因为这些核的行为像绕着一个轴回转。因为上述这些核是带正电荷的，这些回转的核的行动像一个小磁铁，因此会与应用的磁场发生作用。如果将蛋白质置于一个强磁场中，这些核的回转会沿着磁场的方向排列。如果采用适当频率的射频能，这些排列会转化到激发态。随后核回复到它们的基态，这个过程中发射出射频辐射，这可以检测和测量出来。任何给定的核发射的精确频率都受到其分子环境的影响，发射频率的变化可以用来提供有关蛋白质的三维结构的信息。

实验测定的蛋白质三维结构信息以原子坐标组的形式储存在各种数据库中。首要的这类数据库是 Brookhaven 蛋白质数据库（Protein database，PDB），可以通过互联网到 http：//www. pdb. bnl. gov 访问。另外，很多不同的网站也提供了一些可以从原子坐标生成蛋白质结构模型的免费软件。这些结构可以交互式地观看（即旋转和移动）。RasMol（网址是 http：//www. umass. edu/microbio/rasmol/）是这类软件中最有名的。另外一个程序术语为

Mage，提供了交互的蛋白质结构模型，命名为 kinemages（http：//www. faseb. org/protein/kinemages/kinpage. html）。

1.4 蛋白质的翻译后修饰

很多多肽在核糖体装配期间和装配之后都经历了共价修饰。尽管也有其他很多不同的修饰存在，但最常观察到的修饰是蛋白质水解过程、糖基化和磷酸化（表 1.7）。这些修饰既影响了多肽的生物活力也影响结构稳定性。它们也改变了多肽的物理化学性质和其他性质，这一事实有助于促进对它们的识别。

表 1.7 多肽可能经历的翻译后修饰的类型

修　饰	例　子
蛋白质水解处理	很多蛋白质只有在经历蛋白质裂解后才具有生物活性(如:某些血液因子)
糖基化	对某些蛋白质来说,糖基化可以增大水溶性、影响生物半衰期或生物活性
磷酸化	影响和调节各种多肽类激素的生物活性
乙酰化作用	功能未知
酰化	可能帮助某些多肽与生物膜作用或锚定在膜上
氨基化	影响某些多肽的生物活性或稳定性
硫化	影响某些神经多肽的生物活力和某些多肽的水解过程
羟基化作用	对特定蛋白质的结构装配很重要
γ-羧基谷氨酰胺形成	使某些血液蛋白质能够结合钙离子
ADP 核糖基化作用	调节各种蛋白质的生物活性
二硫键形成	帮助稳定某些蛋白质的构象

注：其他的细节参见正文部分。

1.4.1 蛋白酶水解过程

蛋白酶水解过程指的是在多肽合成之后对多肽进行有限的和特定的切割。多肽切割前（“原”）的形式一般是没有活性的，蛋白酶水解后得到激活。服从于这个过程的多数蛋白质都要输送到细胞器或者从细胞中分泌出来。这样的例子包括哺乳动物消化酶胰蛋白酶、凝乳蛋白酶和胃蛋白酶。它们最初在胰腺中合成，并以“原”或“酶原”前体的形式储存胰腺中。另外的例子包括一大类血液凝固因子（第 5 章）和胰岛素（第 7 章）。蛋白水解激活是非常特异的，一般都是不可逆的。

1.4.2 糖基化

糖基化（糖类基团的附加）是与真核生物蛋白质特别是细胞外蛋白或细胞表面蛋白相关的翻译后修饰中最常见的形式。有些情况下，很多糖蛋白去除糖组分后并没有对其生物学性质产生可检测到的影响。糖蛋白的无糖形式可以通过两种方法产生，一是在细胞生长介质中加入糖基化途径的抑制剂（如抗生素衣霉素），或是利用葡萄糖苷酶将已经糖基化的糖蛋白的糖组分降解。然而在其他情况下，糖组分对糖蛋白的生物学活性有直接的作用。例如，天然人绒毛促性腺激素（human chorionie gonadotrophin，hCG，第 7 章）是一个高度糖基化

的刺激生殖腺的激素。其糖组分的去除常常会消除其诱导生物学反应的能力，尽管其受体结合的亲和力并没有改变——甚至有时候还会增加。

糖蛋白的糖组分也可以具有多种其他潜在的功能，包括寻找目标和识别。例如溶酶体酶一般是糖基化的，它们的糖组分在指引新合成的酶特异地到溶酶体起着直接的作用。很多激素-细胞因子受体都是糖基化的，它们的糖组分构成了受体-底物结合的重要组成部分。细胞表面的糖在细胞与细胞黏附和识别中扮演重要角色。这些分子作用对于维持多细胞器官的组织完整性非常关键，对于一些过程如受精、细胞分化和肿瘤形成等也是如此。

图 1.16 提供的是一个低聚糖链的例子。

在其他的情况，糖组分可能有助于稳定天然糖蛋白的构象，促使蛋白质更好溶解或控制它的生物半衰期。糖蛋白的糖组分可能的功能是：

① 对于介导某些蛋白质的生物学效应起直接作用（如 hCG 和促红细胞生成素）。

② 瞄准目标：糖组分能帮助目标蛋白到特定的细胞位置（如溶酶体酶）。

③ 识别：在糖蛋白结合其底物时，糖组分常常起直接的作用（如某些细胞因子受体）。

④ 稳定：糖组分有助于稳定糖蛋白的构象，另外保护它们免受蛋白水解酶的攻击。

⑤ 增溶：去除糖组分能够使某些蛋白质远离水分子溶解。

⑥ 增加蛋白质的生物半衰期（减低其血流清理速度）。

能够发生的糖基化有两种类型：*N*-连接的和 *O*-连接的。在 *N*-连接的糖基化情况下，糖链（低聚糖）通过天冬酰胺的氮原子贴附在蛋白质上（Asn）；在 *O*-连接的糖基化系统，糖链贴附在羟基的氧原子上，这些羟基一般是丝氨酸或苏氨酸残基的羟基（图 1.15）。

糖侧链中最常见的单糖包括甘露糖、半乳糖、葡萄糖、海藻糖、*N*-乙酰半乳糖胺、*N*-乙酰葡萄糖胺、木糖和唾液酸。这些糖可以通过不同的序列、以不同的糖苷连接结合在一起。糖蛋白的糖化学因而变得十分复杂。图 1.16 列出了两个简单的寡聚糖链的结构。

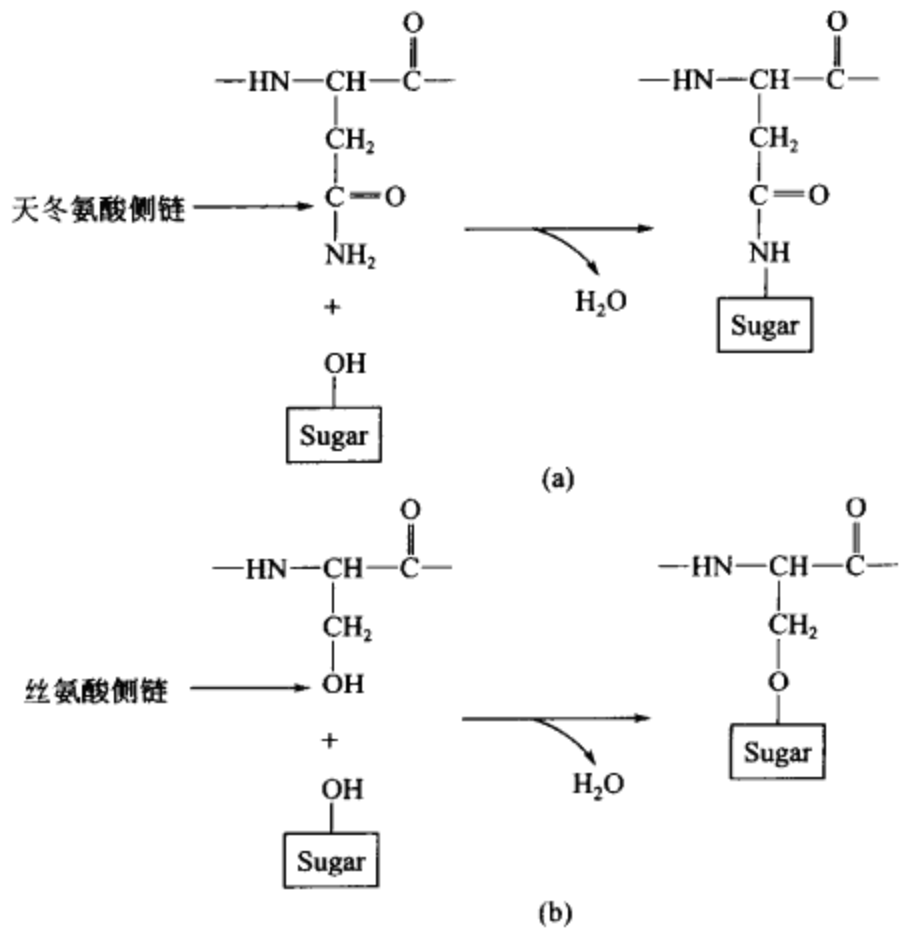


图 1.15　*N*-连接和 *O*-连接的糖基化

（a）氮连接的糖基化；（b）氧连接的糖基化，“Sugar”表示的是一个低聚糖链

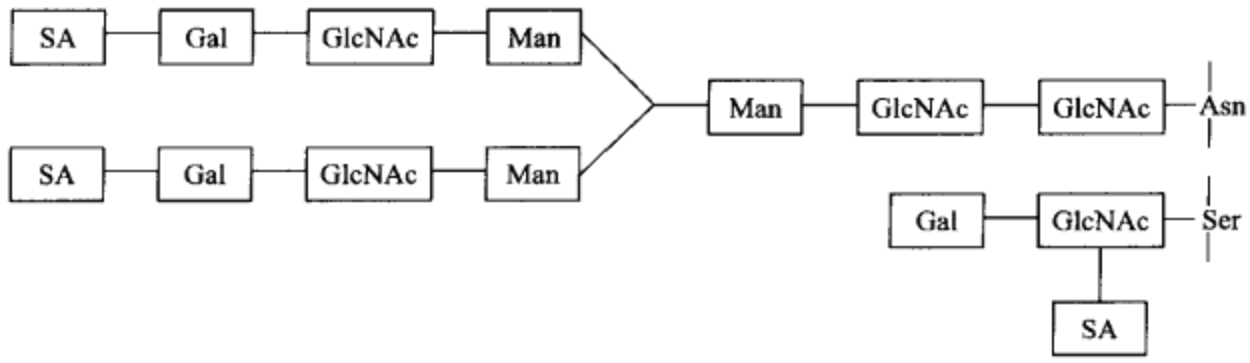


图 1.16 在糖蛋白中出现的低聚糖侧链（一个是 *N*-连接，另外一个是 *O*-连接）结构的两个例子

Man，甘露糖；Gal，半乳糖；SA，唾液酸；GlcNAc，*N*-乙酰基葡萄糖胺；GalNAc❶，*N*-乙酰基半乳糖胺；Ser，丝氨酸；Asn，天冬酰胺

N-连接的糖基化是序列特异性的，包括将预合成的寡聚糖链传递到在特征序列 Asn-X-Ser、Asn-X-Thr 或 Asn-X-Cys 中找到的天冬酰胺残基，这里的 X 代表除了脯氨酸外的任意氨基酸残基。另一个糖基化决定因素必需应用，因为在某些蛋白质中，并不是所有可能的 *N*-连接位点都是糖基化的。*O*-连接的糖基化的决定因素了解得不是很清楚。在很多情况下特征序列识别不是很明显的，在这种情况下，三维结构的特性可能是更重要的。

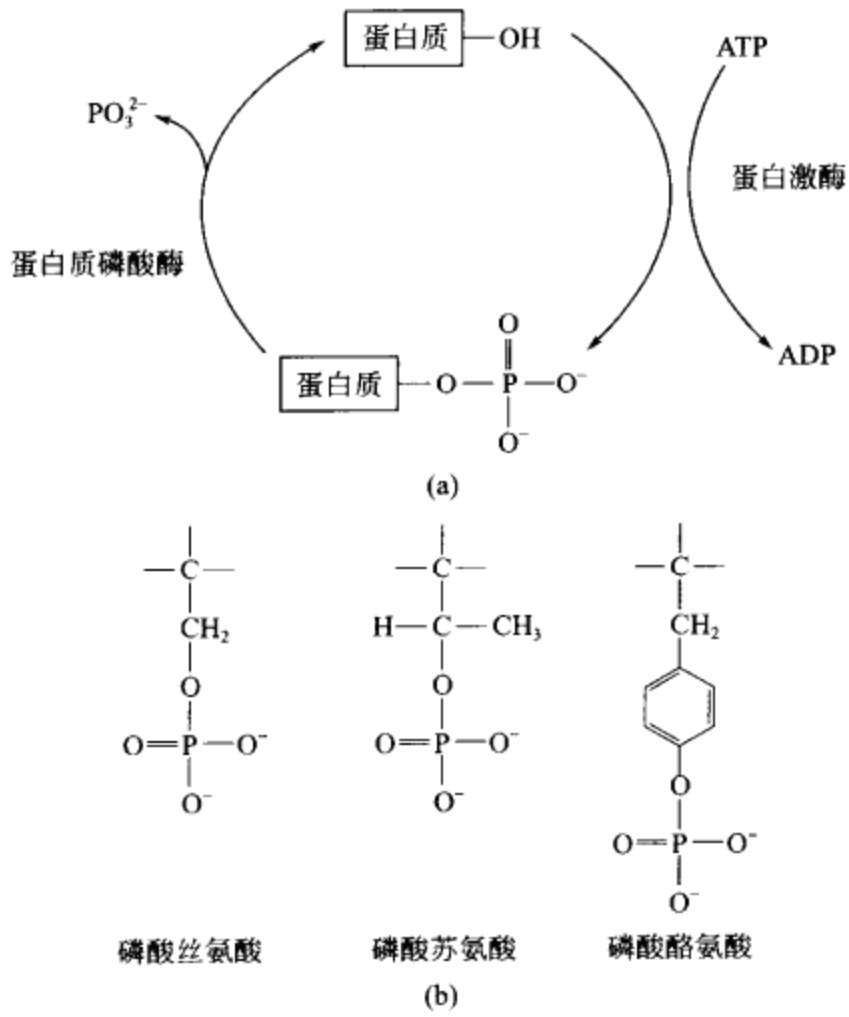


图 1.17

(a) 蛋白质底物通过一个激酶-磷酸化酶机制的可逆磷酸化；(b) 磷酸化基团常常通过丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基的羟基贴附到蛋白质上，Protein 表示蛋白质

1.4.3 磷酸化

可逆磷酸化是另一种形式的翻译后修饰，主要发生在真核生物中，但有时候也会在原核生物中。最常用的磷酸基团供体是 ATP，目标蛋白的磷酸化和去磷酸化由底物特异的蛋白激酶和蛋白质磷酸酯酶催化完成（图 1.17）。磷酸化位点一般是丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的羟基（图 1.17），尽管有时候天冬氨酸、赖氨酸和组氨酸的侧链也能够磷酸化。磷酸化的准确的位点不仅显示了序列特异的特征，而且还可能有特别的三维形状的要求。

在无穷多的事例中，磷酸化直接影响了目标蛋白的生物学活力，磷酸化和去磷酸化对功能的影响像一个可逆的开关。在有些事例中（如肝糖磷酸化酶），磷酸化会导致激活；反之在另外的事例中（肝糖合成酶），磷酸化会导致失活。只有在很少的情况下，磷酸化对功能一点也不重要。例如，牛奶蛋白酪蛋白的磷酸化（见第 13 章）具有营养重要性，而不具有功能重

❶ 图中没有出现，原著如此——译者注。

要性。一个蛋白质的磷酸化因为增加了自己的负电荷数量而改变了其物理化学性质。结果，经常可以通过监控蛋白质在（未变性的）电泳胶的迁移速度的变化来探测蛋白质的磷酸化。

1.4.4　乙酰化、酰化、氨基化

所有在细胞质中合成的真核生物蛋白中有超过 50%有一个 N 端乙酰基团。乙酰基团供体一般是乙酰辅酶 A(CoA)，反应是由 *N*-乙酰转移酶催化完成的（图 1.18），这个酶看起来与核糖体有比较松散的结合。在有些情况下，N 端乙酰化看起来可能发生在蛋白质完全合成之前，在其他的情况，乙酰化发生在翻译后修饰期间。决定一个多肽是否乙酰化的判断标准还没有掌握，对于这种翻译后修饰的精确功能也同样是这样。

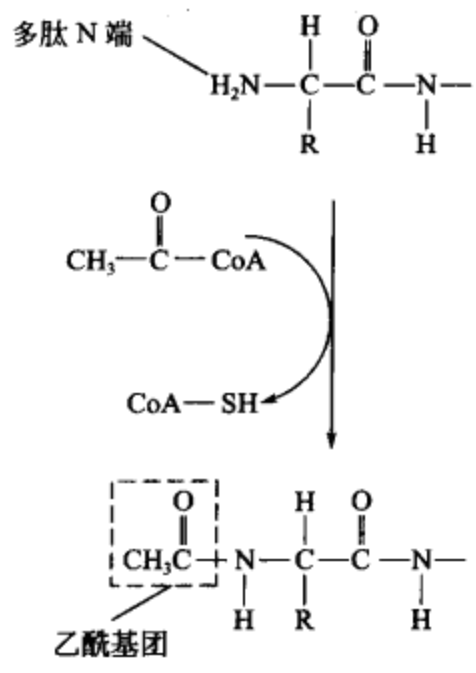


图 1.18　多肽 N 端氨基基团通过 *N*-乙酰转移酶催化进行的乙酰化
乙酰基团的供体是乙酰 CoA

蛋白质的酰化指的是将脂肪酸直接以共价键贴附到多肽主链上。最常见的与多肽链酰化有关联的脂肪酸是 16 碳饱和棕榈酸和 14 碳饱和肉豆蔻酸。棕榈酸主要通过酯键或硫酯键以共价形式连接到半胱氨酸、丝氨酸或苏氨酸上，而肉豆蔻酸则总是通过一个酰胺键以共价形式连接到 N 端的甘氨酸上（图 1.19）。酰化的多肽看起来在真核生物中是普遍存在的，在很多病毒中也有发现。

肉豆蔻酰化（肉豆蔻酸的共价连接）很可能是与翻译过程协同进行的（即在多肽合成完成之前），并由肉豆蔻酰化 CoA：蛋白质 *N*-肉豆蔻酰转移酶催化。基于酶的棕榈酸贴附是一

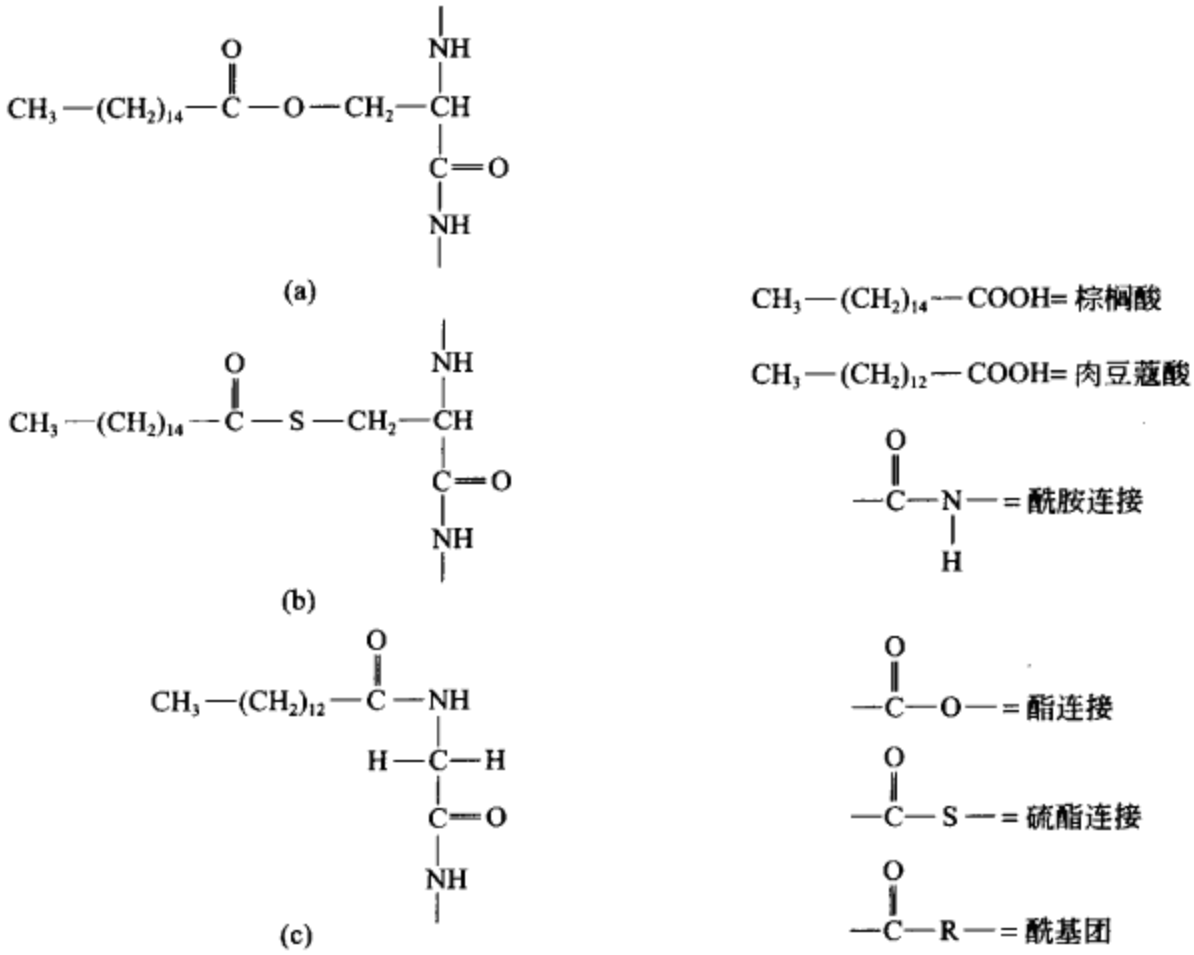


图 1.19

（a）棕榈酸通过酯键与丝氨酸残基的连接；（b）棕榈酸通过硫酯键与半胱氨酸残基的连接；（c）肉豆蔻酸通过酰胺键与 N 端甘氨酸残基的连接

个比较复杂的翻译后修饰事件，可能涉及到好几个酶。很大范围类型的蛋白质都可以酰化，包括各类的细胞质蛋白质和膜蛋白，以及病毒的结构蛋白（表 1.8）。脂肪酸组分的精确功能在多数情况下并不确定。最初认为它的功能是在将蛋白质锚定在膜上或者允许蛋白质与膜作用方面，但这很可能不是它的主要功能。脂肪酸组分在促进蛋白质-蛋白质相互作用方面可能扮演着更重要的角色。很多酰化的多肽是多亚基蛋白复合物的组成部分；在很多事例中，脂肪酸部分的去除对多亚基复合物的亚基之间的相互作用以及复合物的生物活力有负面的影响。不同的酰化病毒衣壳蛋白的脂肪酸组分也似乎也有助于稳定这些结构蛋白之间的相互作用。虽然棕榈酸和肉豆蔻酸是最常见的与多肽链酰化有关联的脂肪酸，但是其他基于脂质的物质也可能用到；这些物质包括硬脂酸、磷脂酰肌糖和法呢醛基团。

表 1.8　某些乙酰化蛋白的代表范例

蛋　白　质	细 胞 定 位	脂　肪　酸
依赖 cAMP 的蛋白激酶	细胞质	肉豆蔻酸
细胞色素 b_5 还原酶	ER 和线粒体	肉豆蔻酸
Gi 和 Goα 亚基	质膜	肉豆蔻酸
胰岛素受体	质膜	棕榈酸
白介素 1 受体	质膜	棕榈酸
转铁蛋白受体	质膜	棕榈酸
视紫质	视网膜上的膜	棕榈酸
P55 和 P28	HIV 病毒	肉豆蔻酸
VP4	细小的核糖核酸病毒	肉豆蔻酸
P19(gag)	HTLV1	肉豆蔻酸
HA	流行性感冒病毒	棕榈酸
gE	单纯疱疹病毒	棕榈酸

注：HIV，人类免疫缺陷病毒；HTLV1，人类 T 淋巴样病毒 1。表中也列出了连接的脂肪酸基团部分和酰化蛋白的定位。

1.5　蛋白质的稳定性和折叠

在生物合成后，一个多肽会折叠成其天然构象，天然构象在结构上是稳定的，功能上是有活性的。多肽链最终采取的构象依赖于其氨基酸序列，这解释了为什么不同的多肽链有不同的特征构象。以前注意到二级结构片段是通过相邻氨基酸之间的短程作用来稳定的。相反，三级结构则是通过可能在序列上远离但在蛋白质折叠后空间上很近的氨基酸的作用来稳定。稳定一个多肽链总体构象的主要作用力有：

① 疏水作用；

② 静电作用；

③ 共价连接。

疏水作用是唯一的稳定蛋白质天然构象的最重要因素。“疏水效应”指的是非极性物质尽量避开与极性溶剂（如水）接触的倾向。非极性氨基酸构成了实际的所有多肽的一级序列的很大比例。这些多肽链会通过折叠使埋藏在多肽内部的疏水氨基酸数量尽可能多，这样来避开周围的水环境。这种情况在能量上是最有利的。

能够使分子稳定的静电作用包括范德瓦尔斯力（这是相对较弱的）、氢键和离子相互作

用。尽管这些作用远没有共价键作用强（表 1.9），但是由于在多肽链内有很多这样的作用，从而使它们整体上很强。

表 1.9　与各种静电相关的键的近似键能，以及与碳-碳单键的比较

键　类　型	键强度/kJ·mol^{-1}
范德瓦尔斯力	10
氢键	20
离子作用	86
碳碳单键	350

多肽链呈现出广泛的分子内氢键网络，这些键对整体构象的稳定性并没有显著的贡献。这是因为在折叠状态的多肽链中形成氢键的原子可以在非折叠状态下与水分子形成能量相当的氢键。带（相反）电荷氨基酸侧链之间的离子吸引也对蛋白质构象的稳定有一定贡献。这些连接称为盐键，可以想到这些作用一般都位于多肽分子的表面。

二硫键代表了稳定多肽链天然三维结构的主要共价键类型。由于细胞内环境一般都是还原性环境，所以尽管细胞内蛋白质一般都有多个半胱氨酸残基，但它们很少形成二硫键连接。相反，细胞外蛋白质常常暴露在氧化环境中，有助于形成二硫键。在很多情况下二硫键的还原（即打开）对多肽链的天然构象影响很小。但是在有的情况下（特别是富含二硫键的蛋白质），二硫键的破坏确实会使蛋白质失去构象的稳定性。在这种情况下，二硫键连接可能起着将结构域-三级结构中的功能或结构单元“锁”定在适当位置的作用。

迄今出现的蛋白质结构的描述可能会导致这样一个结论，即蛋白质的结构是静止的、刚性的。但这不是实际情况。蛋白质的组成原子是在不断地运动中。从小到单个氨基酸残基侧链大到整个结构域的基团都可能因为随机运动而离开原来的位置，幅度可达将近 0.2nm。蛋白质的构象因此展现一定程度的柔性，这种运动称为“呼吸”。

呼吸有时候对于功能是有非常重要意义的，例如允许小分子扩散进出蛋白质的内核。除了呼吸，某些蛋白质还要经历明显的构象变化（常常是可逆的）。这些变化对于功能是意义明显的。多数情况下是由生物特异的配体相互作用所诱导的（如酶结合底物或抗原结合到抗体）。

当前在已经测定氨基酸序列的多肽的数量和已经解析三维结构的多肽数量之间有一个巨大的差距，而且差距越来越大。知道了实验方法解析蛋白质三维结构的复杂性，就不难理解为什么科学家一直在努力建立从氨基酸序列资料来预测蛋白质高级结构的方法了。虽然已经发展了几种比较成功的二级结构预测方法，但从一级序列数据预测三级结构的方法至今还没有建立。

已经报道了超过 20 种不同的预测二级结构的方法（表 1.10）。这些方法大致属于两大类：①经验统计方法，基于对已知三维结构的蛋白质进行研究得到的数据和这些蛋白质一级氨基酸序列与其结构性质之间的相互联系；②基于像折叠紧密度之类的物理化学标准的方法（折叠形态的产生展现了一个紧密堆积的疏水内核和极性表面）。

表 1.10　当前采用的部分二级结构预测方法

方　法	预测基础
Chou 和 Fasman 方法	经验性统计方法
Garnier、Osguthorpe 和 Robson(GOR)方法	经验性统计方法
EMBL profile 神经网络(PHD)方法	经验性统计方法
蛋白质序列分析(Protein sequence analysis，PSA)方法	经验性统计方法
Lim 方法	物理化学标准

注：更进一步的细节见正文。

所有这些预测方法中的大多数最多只有 50%～70%的准确度。相对比较大的不准确项来自于这样一个事实，即折叠的（三级）结构对于某些区域内的二级结构的特性和程度都施加了制约。到目前所有总结出来的与二级结构和氨基酸序列数据关联的“规则”都没有考虑这个因素。

Chou 和 Fasman 方法依然是最普遍的预测方法。这些科学家研究了一定数量的已经用 X 射线晶体学方法测定三维结构的蛋白质的结构细节。这使他们能够建立每个氨基酸残基的“构象偏好数据”，这个数据基本上关联着氨基酸与 α 螺旋片段及 β 折叠片段的兼容度（表 1.11）。将偏好数据应用到一个多肽链的氨基酸序列时，就可以指认出推定的螺旋或折叠股区域。

用 Chou 和 Fasman 方法进行的分析也使下面的观察指标得以出笼：

① 一个 α 螺旋片段经常由一段包含至少 4 个 Hα 或 hα 残基（表 1.11）的 6 残基序列开始。

② 如果存在脯氨酸残基，一般在螺旋的氨基端。

③ 一个 α 螺旋片段中 4 个任意连续的残基小组其 Pα 平均值大于 1.0（表 1.11）。

④ 一个 β 折叠股片段经常由一段包含至少 3 个 Hβ 或 Hβ 残基的 5 残基序列开始。

⑤ 一个 β 折叠股片段中 4 个任意连续的残基小组其 Pβ 平均值大于 1.0。

从更低一级结构信息准确预测多肽链的三维结构依然有待于完成。尽管一项称为 Threading 的技术为直接从氨基酸序列数据预测三级结构这一目的的进步带来了很多支持，但它仍然是遥远的将来的事情。三维结构分析表明，只有有限个稳定的蛋白质折叠模式存在，而且很多没有关联的氨基酸序列可以产生相同的折叠模式（折叠模式指的是一个类似于结构域的结构，但在很多蛋白质中是共有的）。通过分析包含多肽三级结构的数据库，就有可能得到各种不同的序列可能采取何种折叠模式的信息。

表 1.11　与 α 螺旋和 β 折叠伸展有关的氨基酸残基的构象偏好和指认

α 螺旋			β 折叠		
残基	Pα	指认	残基	Pβ	指认
Glu	1.44	Hα	Val	1.64	Hβ
Ala	1.39	Hα	Ile	1.57	Hβ
Met	1.32	Hα	Thr	1.33	hβ
Leu	1.30	Hα	Tyr	1.31	hβ
Lys	1.21	hα	Trp	1.24	hβ
His	1.12	hα	Phe	1.23	hβ
Gln	1.12	hα	Leu	1.17	hβ
Phe	1.11	hα	Cys	1.07	hβ
Asp	1.06	hα	Met	1.01	Iβ
Trp	1.03	Iα	Gln	1.00	Iβ
Arg	1.00	Iα	Ser	0.94	iβ
Ile	0.99	iα	Arg	0.94	iβ
Val	0.97	iα	Gly	0.87	iβ
Cys	0.95	iα	His	0.83	iβ
Thr	0.78	iα	Ala	0.79	iβ
Asn	0.78	iα	Lys	0.73	bβ
Tyr	0.73	bα	Asp	0.66	bβ
Ser	0.72	bα	Asn	0.66	bβ
Gly	0.63	Bα	Pro	0.62	Bβ
Pro	0.55	Bα	Glu	0.51	Bβ

注：Pα＝形成 α 螺旋区域的倾向；Pβ＝形成 β 折叠区域的倾向；Hα＝强螺旋形成者；hα＝螺旋形成者；Iα＝弱的螺旋形成者；iα＝无关紧要者；bα＝螺旋中断者；Bα＝强的螺旋中断者。对于 β 折叠的情况是类似的名称，只不过用 β 取代 α。经过出版者 John Wiley & Sons 的友好允许，从 “Current Protocols in Protein Science” 一书上复制。

Threading 本质上是把准备预测三维结构的多肽链的序列与产生特定折叠模式已知的序列数据库进行比较。可以用计算机程序评估目标序列采取每一种已知的折叠结构的可能性。

虽然准确预测三维结构依然是未来的期望，但是如果二级结构单元已经得到指认，那么准确预测三级结构就可能比较可行了。通过研究已知的三级结构，就会慢慢阐明二级结构单元堆积、组装为更高级结构（如特定的模体和结构域）的规则。

前面已经讨论了将一条多肽链折叠为其天然构象的各种作用力。对于一个典型的球状多肽来讲，与这种稳定作用（表 1.10）相关联的所有键能加起来的总数量会达到数千 $kJ \cdot mol^{-1}$。然而热力学分析表明，一个典型的 200 个氨基酸残基的多肽链在其折叠状态和失活状态的自由能之差仅为 80～100$kJ \cdot mol^{-1}$数量级。这仅相当于几个氢键的能量。在非折叠态，链内非键作用（稳定作用）的数量没有达到最大，但生成一些新的链内作用来“维持”失活状态。这包括在合适的氨基酸基团和周围的水分子之间形成的大量的氢键。而且热力学第二定律说明，一个分子以无规则状态存在比以高度有序的状态在能量上更有利（熵的概念）。蛋白质在其折叠状态只是处在比较稳定的边缘这一事实在功能上是很有意义的。这在结构上保证了蛋白质某种程度的柔性，使它们能够容易地经历适合其生物功能的各种构象变化。

通过对在相对恶劣条件下发挥功能的蛋白质进行研究，帮助阐明了影响天然多肽构象的固有稳定性的因素。近来对极端微生物（生活在极端环境条件下的生物物种，第 10 章）蛋白质的研究，大大加深了对构象稳定性的理解。已经测定了一定数量的来自于不同的嗜低温微生物、常温微生物、嗜热微生物和嗜超高温微生物（第 10 章）的同源蛋白质的三维结构。这有助于找出使蛋白质在特定的天然生理条件下稳定的在结构性质方面上的变化。热力学分析显示，天然状态和变性状态之间边缘稳定的规律能够扩展到极端环境条件下分离出的蛋白质。

可以想像，为了补偿提高温度带来的不稳定影响，从嗜热微生物和嗜超高温微生物中分离出的蛋白质具有更高标准的分子内稳定作用。相反，也可以预测，为了保持构象的柔性有一个适合的自由度，从嗜低温微生物分离出的蛋白质具有更低程度的分子内稳定作用。虽然不同的蛋白质有不同的处理方法，但从广义的角度看，这些原理可以显现出来。热稳定性升高与下列结构适应性改变的一个或几个有关：

① 多肽分子内氢键数量的增加；

② 盐键数量的增加；

③ 多肽紧密度的增加（提高疏水内核的堆积）；

④ 延长螺旋区域。

相反，增强来源于嗜低温微生物蛋白质的稳定性和功能柔性，看起来应该从下面的一个或几个适应性开始：

① 减少盐桥连接；

② 降低疏水内核的原子间的作用（降低疏水性）；

③ 增加蛋白质表面与周围溶剂之间的氢键；

④ 引入伸出的表面环区。

1.5.1　折叠途径

上面的讨论集中在能够使完全折叠的蛋白质结构稳定的因素。在本节，着重点放在折叠事件本身。从热力学角度看，一个蛋白质会从一个能量较高的非折叠状态折叠为一个能量较

低的折叠状态。这个过程是一个快速的过程，一般持续一秒到数秒时间。折叠的速度说明折叠过程时经过一个直接的途径，而不是经过了随机的构象搜索直到无意中发现最稳定的结构排列。折叠途径是先从起始快速形成一个比较致密的、部分折叠的“熔球态”开始，然后以较慢的速度完成折叠进程（图 1.20）。

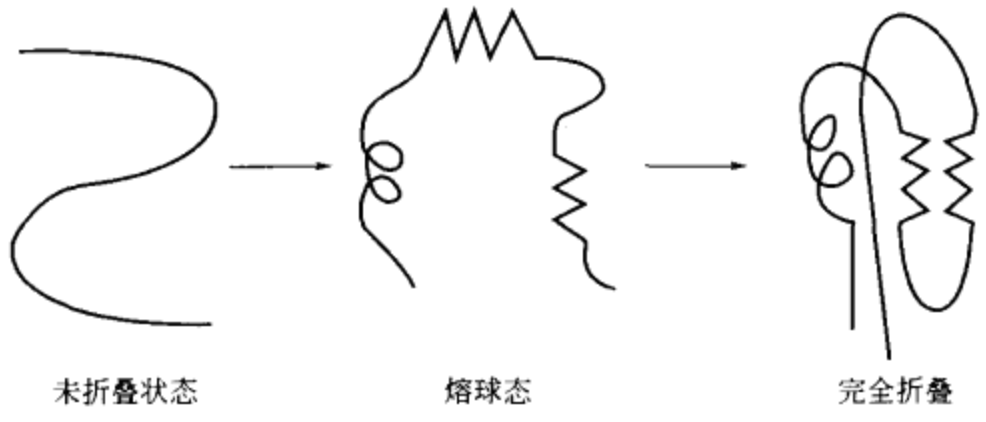


图 1.20　蛋白质折叠途径的概述

细节参见正文

“熔球态”具有天然蛋白质的大部分二级结构单元，但只有有限程度的最终的三级结构。“熔球态”的形成只需要几毫秒的时间，称为疏水折拢。正像名字暗示的那样，这个过程主要的驱动力是使疏水氨基酸之间相互接触、避开周围的水分子带来的有利的能量变化。疏水折拢反过来引导二级结构形成；疏水残基的内在化也促进了与疏水基团相关联肽键的极性—NH及 C═O 基团的内在化。这阻碍了后者与周围的水分子形成稳定化氢键。但是如果这些基团彼此之间能够形成氢键，那么就会抵消这种能量不利的情况。α 螺旋或 β 折叠的形成会尽可能促使极性基团形成氢键。

在随后和最后的蛋白质折叠阶段，三级结构单元就会形成。最初它们很可能是模体或亚结构域，然后导致完全的折叠。有些蛋白质可能遵循一条折叠途径，而其他蛋白质可能有多条途径；不管怎样，它们都会导致完整的蛋白质折叠。

很多蛋白质在体外都可以自发和准确地折叠，尽管其中某些看起来比它们在体内折叠得慢，而且准确度低。虽然一级序列最终决定了三级结构，但是仍然知道有很多正确折叠的阻碍存在。它们包括：

① 部分折叠的中间体经由分子间疏水作用而引起的聚集；

② 脯氨酸残基的异构化；

③ 半胱氨酸错误配对而形成的二硫键连接。

细胞似乎发展出不同的机制来克服这些障碍或尽可能减少障碍。

分子伴侣是一类帮助多肽链形成其正确的三维结构的蛋白质，它主要是通过阻止或校正出现的不合理的疏水结合来帮助肽链折叠。分子伴侣中最先命名的是热休克蛋白（heat-shock proteins，Hsp），在温度升高时，它们的细胞内浓度会增大。现在已经知道存在的有两大类分子伴侣：Hsp70 蛋白和伴侣素。这二者都包含疏水区域，这些区域可以跟未折叠或错误折叠的多肽链作用，经过一个依赖 ATP 的过程帮助它们正确折叠。

大肠杆菌的伴侣已经被研究得比较详细了。由两个类型的蛋白质构成的一个大复合物组成了分子伴侣。两个蛋白质类型是 60ku 的 Hsp60 蛋白（以 Gro EL 知名）和 10ku 的 Hsp 10 蛋白（以 Gro ES 知名）。完整结构包括 14 个 Gro EL 亚基，这 14 个亚基组成了一个大约 15nm 长、直径为 14nm 的空心圆筒。7 个 Gro ES 亚基与圆桶的一段作用并结合在上面。空

洞的内壁有几个富含疏水残基的区域。

完整的分子伴侣会直接与多肽链中未折叠或错误折叠的区域作用，但不与正确折叠的区域作用。这种识别机制目前还没有完全清楚，但是在未折叠或错误折叠的区域可能存在的大面积疏水斑块与分子伴侣空洞内表面的疏水残基之间的疏水作用可能起了关键作用。至于如何协助随后的正确折叠的精确的分子细节仍有待于阐明。

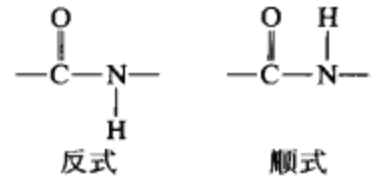


图 1.21　肽键的顺式与反式形状

肽基脯氨酰异构酶和蛋白质二硫键异构酶也对于体内很多蛋白质的有效折叠和正确折叠很有帮助。正像前面提到的那样，多肽链的肽键一般是反式构象。尽管顺式构象（图 1.21）也是可能的，但是却远不是热力学上稳定的，因而很少出现在天然多肽中。然而在某些多肽中，确实有些肽键是顺式的，这些肽键的 NH 基团来自脯氨酸残基。这经常出现在绷紧的弯曲中，这种情况对于结构上的柔性有一定的需要。三维结构的周围环境稳定了顺式构象。在折叠之前，这些稳定环境是不存在的。

在一个未折叠的状态，可能存在一个肽键的顺式形态和反式形态之间的平衡，但是由于后者的稳定性，平衡大大有利于反式。没有受到协助的目标脯氨酸的异构化是一个很慢的过程，常常是折叠的限速步骤。在很多细胞类型中都发现了肽基脯氨酰异构酶，它可以将基于肽键的脯氨酸的异构化速度提高 10^6 倍以上。因此这些酶可以消除体内折叠的限速步骤。

包含二硫键连接的蛋白质的折叠给细胞提出了一个特殊的问题：即保证这些连接中的半胱氨酸残基的正确配对。这个过程被一种称为蛋白质二硫键异构酶的蛋白来帮助实现。这个酶本身就有一些半胱氨酸残基，这些残基有自由的巯基（—SH）。这些基团可以与在目标蛋白中出现的半胱氨酸残基形成临时的二硫键连接。同样，这些酶也可以帮助已经形成的错误的二硫键连接进行分子内重排。

1.5.2　蛋白质工程

重组 DNA 技术的出现直接促进了根据蛋白质的氨基酸序列生产蛋白质的技术的发展。这个过程称为定点突变或蛋白质工程，这个过程控制了编码目标多肽的核苷酸序列的改变，这样可以引入在氨基酸序列中详细而精确地、事先决定地变化（图 1.22）。这些变化包括插入、缺失或取代。蛋白质工程促进了对蛋白质和多肽的氨基酸序列和其结构之间联系的更深一步理解。它为研究蛋白质的结构与功能关系提供了一个强有力的方法。同样，这项技术也对于达到全新蛋白质设计这一人类追求了很久但还很遥远的目标有很大益处。蛋白质工程也可用于对那些商业重要蛋白质的特性进行结构或功能的剪裁。

在近几年，对工程酶的研究投入了很大的努力，主要是加强它们的催化活力、温度稳定性和 pH 稳定性。对很多蛋白模型的研究都表明，将特定的赖氨酸取代为精氨酸、或将甘氨酸取代为丙氨酸会使热稳定性增加。例如，在葡萄糖异构酶中 253 位赖氨酸用精氨酸取代后会提高这个合成的工程酶的热稳定性。用精氨酸取代赖氨酸后可能会通过这样一种方式改变了酶的构象，即提高了氢键结合的整体水平。这当然对蛋白质的稳定性有一个正面的影响。葡萄糖异构酶在商业上的用途是从葡萄糖糖汁中生产果糖糖汁（见第 11 章）。

引入有利于形成二硫键的半胱氨酸残基可以加强蛋白质的稳定性。通过溶菌酶的例子可以说明这一点。溶菌酶在 97 位有一个半胱氨酸，将这个分子 3 位的异亮氨酸残基改变为半胱氨酸会导致形成二硫键，从而提高了酶的稳定性。蛋白质工程在将来有广阔的前景。然而在对有

关决定蛋白质折叠的因素没有更多的了解之前，蛋白质工程的全部潜力还不可能发挥出来。

人组织纤溶酶原激活剂（Human tissue plasminogen activator，t-PA）是一种重要的治疗试剂，它就是一个利用蛋白质工程技术进行过修饰的蛋白质。t-PA 是一种丝氨酸蛋白酶，它在促进纤维蛋白溶解、血块降解方面有重要的作用（见第 5 章）。从 t-PA 内的特定结构域内切除一个三肽序列（Tyr-Phe-Ser）会大大降低这个分子的血浆清除速度。天然 t-PA 在血浆中的半衰期很短，这就要求其用法是延长的静脉灌输。一个利用蛋白质工程改造过的 t-PA 有了更长的血液半衰期，其用法成为了单支的静脉注射。对 t-PA 做了更多的修饰之后不仅增加了其在血液中的半衰期还增强了促进血块溶解的能力。

发现有商业用途的工程蛋白质的另外例子是嵌合及人源化抗体、长效或短效胰岛素和抗氧化清洗酶。在本书后面的章节将讨论这些例子及其他一些例子。

信息框 1.1　通过定点突变改变氨基酸序列

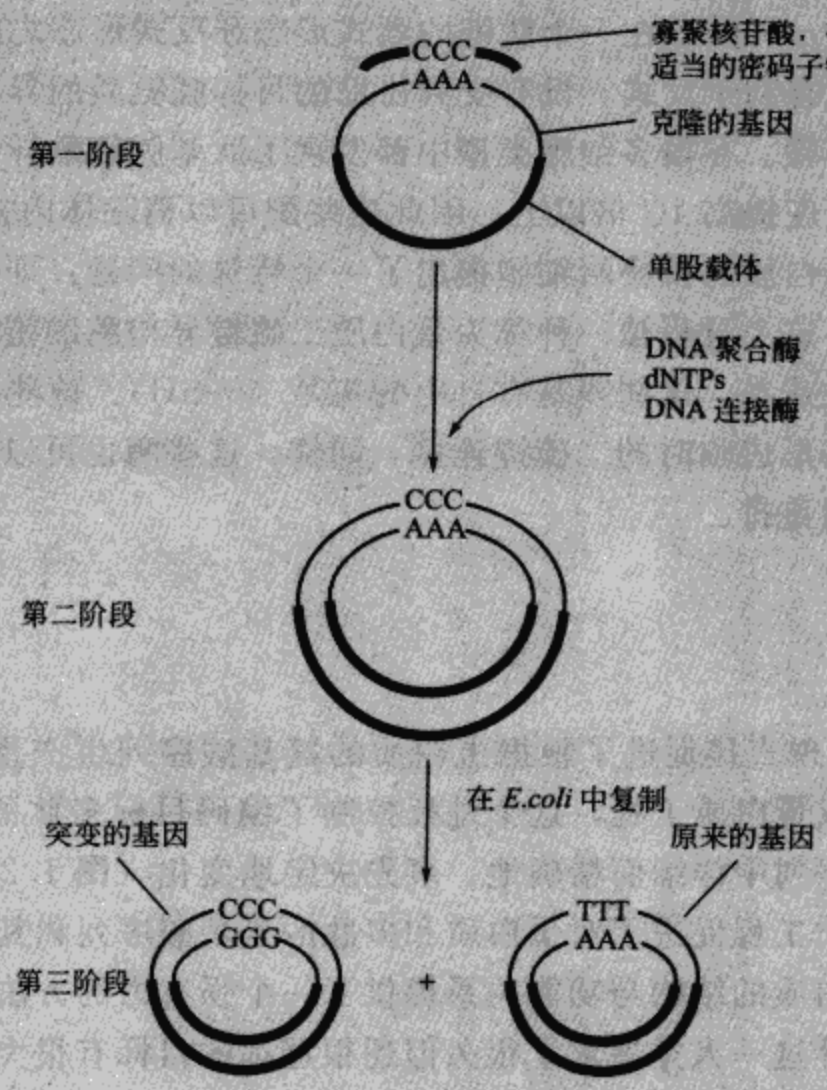


图 1.22　通过定点突变改变氨基酸序列

这个图提供了一个用于在蛋白质氨基酸序列中引入替换、短插入或短缺失的定点突变技术的概况。

首先，将编码这个天然（未改变的）蛋白的基因/cDNA 克隆到一个载体上，在这个载体上可以准备单股 DNA（如各种不同的噬菌体载体）。接着，设计并合成一个合适的寡核苷酸。这个寡核苷酸的两端与计划改变的基因的两端在序列上是互补的。它的中心部位显示了一个与期望改变相对应的核酸序列变化。例如，在图解说明的情况，期望进行一个氨基酸的替换：将赖氨酸（在基因序列中对应的是 AAA）替换为脯氨酸（在编码股中对应的是 GGG）。经过退火之后，这些故意错配的碱基会“凸出来”，但每边的侧翼序列会通过互补碱基配对完全退火。

加入 DNA 聚合酶、dNTP 和 DNA 连接酶会有助于 DNA 合成，形成一个封闭的圆形双环（关联图的第三阶段）。然后将此环引入 *E. coli*，使两个股都得到复制（关联图的第二阶段）。突变基因可以回收并克隆到一个合适的表达载体上，利用标准的重组方法产生大量的期望突变蛋白。

1.6　进一步的阅读材料

图书

Angelitti, R. (1998) *Proteins*. Academic Press, London.

Attwood, T. (1999) *Introduction to Bioinformatics*. Longman, Harlow.

Baxevanis, A. (1998) *Bioinformatics*. John Wiley, Chichester.

Carey, P. (1996) *Protein Engineering and Design*. Academic Press, London.

Coligan, J. *et al*. (1998) *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley, Chichester.

Dobson, C. (1996) *Protein Folding*. Cambridge University Press, Cambridge.

Fersht, A. (1999) Structure and Mechanism in Protein Science. Freeman, Basingstoke.

Higgins, D. (2000) Bioinformatics. *Oxford Unveristy Press*, Oxford.

论文

蛋白质的结构和折叠

Al-Lazikani, B. *et al*. (2001) Protein structure predection. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5** (1), 51－56.

Arai, M. & Kuwajima, K. (2000) Role of the molten globule state in protein folding. *Adv. Protein Chem.* **53**, 209－282.

Bilsen, O & Matthews, C. (2000) Barriers in protein folding reactions. *Adv. Protein Chem.* **53**, 153－207.

Chasse, G. *et al*. (2001) Peptide and protein folding. *J Mol Struct. －Theochem.* **537**, 319－361.

Clarke, A. & Waltho, P. (1997) Protein folding pathways and intermediates. *Curr. Opini. Biotechnol.* **8**, 400－410.

Domingues, F. *et al*. (2000) The role of protein structure in genomics. *FEBS Lett.* **476**, (1－2), 98－102.

Osguthorpe, D. (2000) Ab initio protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, (2), 146－152

Radford, S. (2000) Protein folding; progress made and promises ahead. *Trends Biochem. Sci.* **25**, (12), 611－618.

Robertson, A & Murphy, K. (1997) Protein structure and the energetics of protein stability. *Chem. Rev.* **97** (5), 1251－1267.

Sadana, A. & Vo-Dinh, T. (2001) Biomedical implications of protein folding and mis-folding. *Biotechnol Appl. Biochem.* **33**, 7－16.

蛋白质结构的测定

Beauchamp, J & Isaacs, N. (1999) Methods for X-ray diffraction analysis of macromolecular structures. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, (5), 525－529.

Clore, G. & Gronenborn, A. (1998) NMR structure determination of proteins and protein complexes larger than 20kda, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 564－570.

Fischer, M. *et al*. (1998) Protein NMR relaxation; theory, applications and outlook. *Progr. Nucl. Magn. Res. Spectrosc.* **33**, (4), 207－272.

Kussmann, M & Roepstorff, P. (1998) Characterization of the covalent structure of proteins from biological material by MALDI mass spectrometry-possibilities and limitations. *Spectroscopy* **14**, (1), 1－27.

Smyth, M & Martin, J. (2000) X ray crystallography. *J Clin. Pathol. -Mol. Pathol.* **53**, (1), 8－14.

Uson, I & Sheldrick, G. (1999) Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr. Opin.*

Struct. Biol. **9** (5), 643－648.

Wiencek, J. (1999) New strategies for protein crystal growth. *Annu. Rev Biomed. Eng.* **1**, 505－534.

Wilmouth, R. *et al.* (2000) Recent sucesses in time-resolved protein crystallography. *Natural Products Reports.* **17** (6), 527－533.

蛋白质的稳定性和翻译后修饰

Bayle, J. & Crabtree, G. (1997) Protein acetylation; more than chromatin modification to regulate transcription, *Chem. Biol.* **4** (12), 885－888.

Elbein, A. (1991) The role of N-linked oligosaccharides in glycoprotein function. *Trends Biotechnol.* **9**, 346－352.

Imperiali, B. & O'Connor, S. (1999) Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr. Opin. Chen. Biol.* **3** (6), 643－649.

Kobata, A. (1992) Structure and function of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* **209**, 483－501.

Li, J. & Assmann, S. (2000) Protein phosphorylation and ion transport; a case study in guard cells. *Adv. Bot. Res.* **32**, 459－479.

McLihnney, R. (1990) The fats of life; the importance and function of protein acylation. *Trends Biochem. Sci* 387－391.

Merry, T. (1999) Current techniques in protein glycosylation analysis-a guide to their application. *Acta Biochem. Polon.* **46** (2), 303－314.

Parodi, A. (2000) Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 69－93.

Sietz, O. (2000) Glycopeptide synthesis and the effects of glycosylation on protein structure and activity. *Chembiochem* **1** (4), 215－246.

Toroser, D. & Huber, S. (2000) Carbon and nitrogen metabolism and reversable protein phosphorylation. *Adv. Bot Res.* **32**, 435－458.

Ueda, K. (1985) ADP-ribosylation *Annu Rev. Biochem.* **54**, 73－100.

Yan, J. *et al.* (1998) Protein phosphorylation; technologies for the identification of phosphoamino acids. *J Chromatography A.* **808** (1－2), 23－41.

蛋白质的稳定性

Dahiyat, B. (1999) In silico design for protein stabilization. *Curr. Opin. Biotech nol.* **10** (4), 387－390.

Jaenicke, R. (1991) Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* **202**, 715－728.

Lee, B. & Vasmatis, G. (1997) Stabilization of protein structures. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 423－428.

O'Fagain, C. (1995) Understanding and increasing protein stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1252**, 1－14.

蛋白质工程

Bryan, P. (2000) Protein engineering of subtilisin. *Biochim. Biophys. Acta-Prot. Struct. Mol. Enzymol.* **1543** (2), 203－222.

Harris, J. & Craik, C. (1998) Engineering enzyme specificity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 127－132.

Hartley, B. *et al.* (2000) Glucose isomerase; insights into protein engineering for increased thermostability. *Biochim. Biophys. Acta-Prot. Struct. Mol. Enzymol.* **1543** (2), 294－335.

Rubingh, D. (1997) Protein engineering from a bioindustry point of view. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8** (4), 417－422.

Schulein; M. (2000) Protein engineering of cellulases. *Biochim. Biophys. Acta-Prot. Struct. Mol. Enzymol.* **1543** (2), 239－252.

Shanklin, J. (2000) Exploring the possibilites of protein engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3** (3), 243－248.

Steipe, B. (1999) Evolutionary approaches to protein engineering. *Combinat. Chem. Biol.* **243**, 55－86.

Svenden, A. (2000) Lipase protein engineering. *Biochim. Biophys. Acta-Prot. Struct. Mol. Enzymol.* **1543** (2), 223－238.

(岳俊杰　译　　苏国富　校)

第2章

蛋白质的来源

2.1 引　　言

蛋白质分离、鉴定和/或利用的前提是要有适当的蛋白质来源。在极少数情况下，所需的特异蛋白质来源于特殊种类或是由非常有限的种类产生［如怀孕母马血清中的促性腺激素（pregnant mare serum gonadotrophin，PMSG）只存在于马体中］，这时蛋白质来源的选择是特定的；而大多数情况，所需蛋白质可以在很多种类生物体中产生，因此应选择蛋白质来源。

所需蛋白质的目的也影响了来源的选择。如果目标蛋白是用于学术研究，研究者总是选择广泛的蛋白质来源，另一方面，一些科研项目由于本身特性，研究者无法自由选择蛋白质的来源，如果蛋白质是为了应用/工业化生产，那么对蛋白质来源就应进行非常认真地选择。影响选择蛋白质来源的因素主要包括：

① 所需蛋白质的技术特性：哪种来源的蛋白质生理生化特性最适于其应用目的呢？例如在动物饲料中为了得到特殊营养所添加的许多种类酶（第 12 章），因为在动物消化道中，这些酶在 37℃及胃和小肠的 pH 范围内，具有很高的活性。

② 蛋白质来源的实用性：蛋白质来源应该是实用的或易于培养的。

③ 产量：能高产所需蛋白质来源显然是最合理的。

④ 安全：通常源于生物体的蛋白质必须不得含有任何对健康有害的副产品。

⑤ 管理控制：大多数蛋白质产物上市前应在适当的管理权威机构注册。管理权威机构认可该产品是安全并且能完成其说明书效果后，予以注册为可生产产品，其中蛋白质来源作为权威机构考察的一部分（尤其是安全问题）。

⑥ 专利问题：如果蛋白质需要申请专利，基本原则是确保专利的申请——包括生产产品的细节——不得侵害已存在的专利。

⑦ 消费者理解观念：在一些情况下，消费者或与产品来源相关的公众观念能够影响产品的商业成就（如重组与非重组食品蛋白质产品）。

从以上几点来看，在商业竞争中，无论是技术还是非技术问题，对蛋白质来源选择的影响是显而易见的。如果所需蛋白质是用于纯科学研究，那么非技术因素如专利、管理问题和

公众观念是不重要的。

重组与非重组蛋白

大量天然来源的蛋白质表达水平低，对其分离、研究和应用带来困难，而重组 DNA 技术的出现克服了这一技术障碍，其原理是分离编码蛋白质（已知或未知功能）的基因或 cDNA，并将其插入到一个适合的表达系统中。目前，采用重组 DNA 的方法已经生产了大量的蛋白质，进行应用和科学研究，重组 DNA 技术使蛋白质产品提高了 3 倍，其优点如下。

① 克服了来源问题：一些蛋白质（如许多细胞因子）在自然条件下生产浓度非常低，致使获得大量的产品很难甚至不可能。而采用适当的重组表达系统则可以得以克服。

② 克服了来源安全的问题：许多蛋白质是由危险的或病原的微生物（如蛇、各种病原微生物等）生产的，选择这类未加工的材料是危险的，可能导致终产品中有毒污染物的存在。而重组产品是由非病原、无毒的寄主生物生产的，可解决这些潜在的忧患。

③ 促进了蛋白质氨基酸序列的定向修饰：如第 1 章和第 11 章所述，蛋白质工程在理论和应用上能达到定向修饰蛋白质氨基酸序列。

第 5～13 章论述了目前利用 DNA 重组技术生产的许多特殊的蛋白质商业产品，其中一些见表 2.1。

表 2.1　利用重组 DNA 技术生产的商业蛋白质

蛋　白　质	应　　用	章　　节
血液蛋白(如因子Ⅷ和Ⅸ)	血友病和别的血液病的治疗	5
溶血栓剂(如组织纤溶酶原激活剂,t-PA)	治疗心脏病发作	5
重组“亚单位”疫苗(如乙肝表面抗原)	抗特殊疾病的疫苗	5
工程抗体(嵌合的和人源化抗体)	主要用于肿瘤的体内检测/治疗	6
天然和工程胰岛素	治疗糖尿病(1 型糖尿病)	7
生长激素	治疗身材矮小	7
干扰素	治疗癌症、病毒性疾病	8
胆固醇酯酶	用于确定血液胆固醇水平	9
凝乳酶	奶酪生产	11
各种蛋白酶、酯酶和淀粉酶	添加于去污剂以降解“生物”污染	11 和 12
植酸酶	添加于动物饲料降解饮食中植酸	12

注：在这些商业产品中，一些只是通过重组技术生产的，而另一些（如胰岛素）是由非重组和重组方法生产的。表中列出的蛋白质在相应章节中也有描述。

2.2　微生物作为蛋白质的来源

许多工业生产的蛋白质是由（非重组的）微生物产生的（表 2.2），主要是由有限的几类被称为 GRAS（generally recognized as safe，通常认为是安全的）的微生物合成的。GRAS 微生物包括细菌如枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌及其他的杆菌、乳酸杆菌和链霉菌，GRAS 中真菌包括曲霉属、青霉属、毛霉属和根霉属的许多种，酵母如酿酒酵母通常也认为是安全无毒的。GRAS 微生物必须是非病原的、非毒性的，并且不产生抗生素。由于微生物能通过发酵（图 2.1）在相对短时期内大量培养，作为蛋白质来源它们是很有吸引力的，因此，微生物可用于生产丰富的、合格的所需蛋白质产品，微生物蛋白通常比源于植物或动物的相同的蛋白质更稳定。此外，微生物比动物和植物更易于遗传学操作。

蛋白质来源包括很多细菌、真菌和酵母，这些蛋白质具有医学、分析和工业用途。表2.2列出了讨论这些蛋白质的章号。

表 2.2 一些源于微生物（非重组）的商业蛋白质

蛋白质	来源	应用	章号
链激酶	各种溶血性链球菌	溶血栓剂(降解血凝块)	5
葡激酶	金黄色葡萄球菌	溶血栓剂	5
破伤风类毒素	破伤风梭菌的甲醛处理的毒素	破伤风疫苗	5
天冬酰胺酶	菊色欧文杆菌或大肠杆菌	治疗癌(白血病)	6
葡萄糖氧化酶	黑曲霉	测定血糖水平	9
乙醇脱氢酶	酿酒酵母	测定血液乙醇水平	9
各种淀粉酶	杆菌和米曲霉	淀粉降解	11
各种蛋白酶	杆菌和曲霉	用做降解食品蛋白、去污剂或其他用途	11
纤维素酶	木霉属、黑曲霉和放线菌	降解纤维素	11

许多工业上重要的蛋白质是由微生物发酵直接分泌到培养基中，这些细胞外蛋白产物由于不需要破坏微生物细胞去释放蛋白质，这大大简化了后续的下游加工，因此，一些胞外的有益蛋白质产品就是经离心或过滤去除菌体，再通过很少的纯化步骤而获得所需纯度的终产品的。工业中发酵期间分泌至胞外的蛋白质包括由杆菌产生的各种分解淀粉和蛋白质的酶以及由真菌如 *Trichoderma veridiae* 产生的纤维素酶和别的活性物。

而一些有益蛋白质存在于细胞内，则必须在发酵后收集细胞并破碎，释放出包括所需蛋白质在内的细胞内所有的内容物，并进行复杂的纯化过程而获得终产品。工业上重要的胞内蛋白包括天冬酰胺酶（第6章）、青霉素酰基转移酶（第12章）和葡萄糖异构酶（第11章）。

蛋白质最适来源的鉴定的传统方法是进行大量的菌种筛选，显然有益蛋白质的快速敏感检测试验通常采用活性筛选法，如可催化植酸（六磷酸肌醇，第12章）降解的植酸酶的检测，植酸盐（即肌醇六磷酸钠或钙）与琼脂结合产生不透明圈，植酸酶快速大量筛选是通过在含有肌醇六磷酸的平板上培养，植酸酶的克隆产物由于肌醇六磷酸分解而在琼脂上产生一个清晰的透明圈（图2.2）。

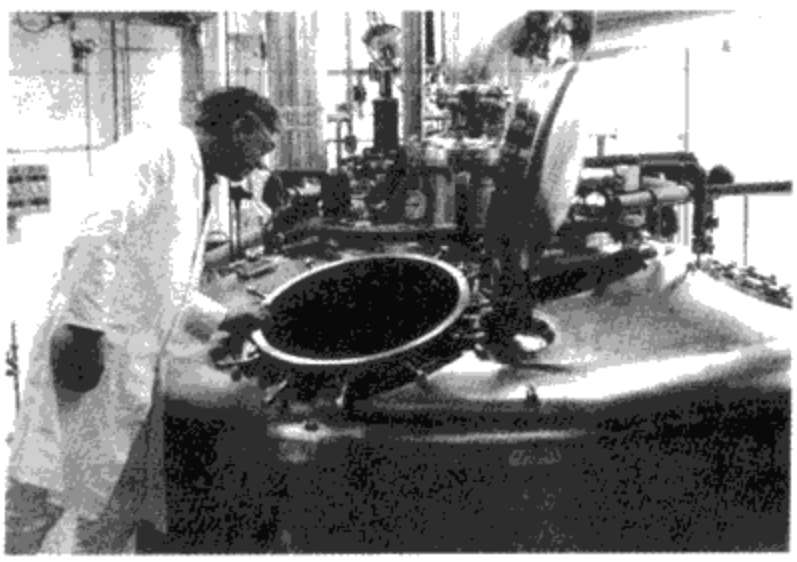


图 2.1 在生物技术产品生产中使用的大规模生物反应器

照片经 Boehringer Mannheim（UK）允许

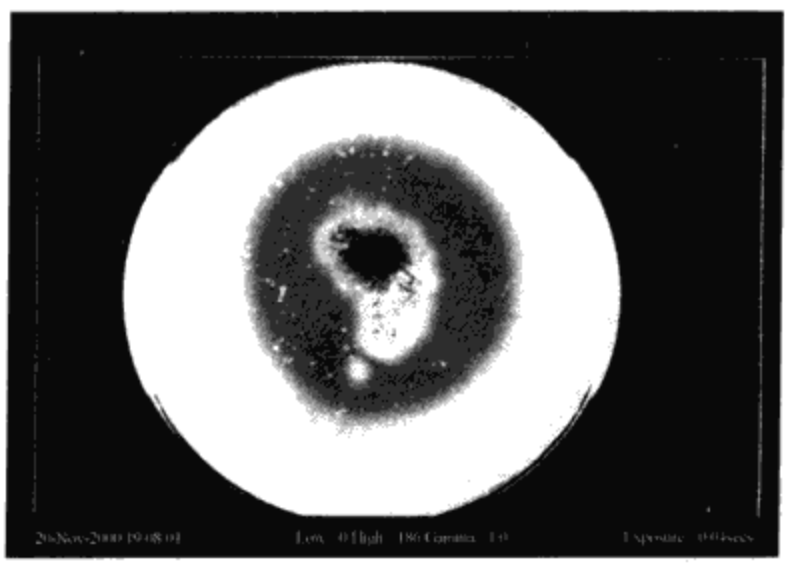


图 2.2

采用在琼脂培养基中加入植酸培养进行可生产植酸酶真菌的筛选，由于植酸酶的生成，在真菌菌丝体周围培养基上形成一个透明圈（参考文中详述）。照片经爱尔兰 Limerick 大学 Anne Casey 允许

因此，有益蛋白质的生产方法为：首先进行初筛，对表达目标蛋白的微生物菌种进行鉴定，然后进一步筛选高产菌株，获得的高产菌株通常采用化学诱变剂或紫外线进行诱变育种，并分离产量提高的正突变菌株。正突变可能以多种方法提高产量，如编码所需蛋白质的基因调控序列突变能导致基因产物高水平表达；或者所需蛋白质的基因发生了突变，则其氨基酸序列改变，在一些情况下，可能使蛋白质功能增强或稳定性提高。

对来源于不同环境中的微生物进行筛选，通常有望获得多种工业上的有益蛋白质。肥沃的土壤是微生物的大本营，土壤中最常见的菌群是细菌，易于使用常规方法筛选，其中杆菌（尤其是蜡样芽孢杆菌群），由于符合 GRAS 要求适于生产酶制剂。土壤中也定居着数百种真菌，特别是在有氧的土壤表层，这些真菌能降解土壤中许多生物材料，它们通过分泌纤维素酶和相关的水溶性胞外酶，降解大量植物聚合分子如纤维素、半纤维素和胶质，然后吸收释放的营养。因此好多这种土壤真菌提供了纤维素酶和相关的水解酶，成为有吸引力的来源。

已经鉴定了多种工业上重要蛋白质的微生物来源，并通过如上所述的筛选策略得以大量分离。对于来源于微生物（或别的生物）的蛋白质生产，重组 DNA 技术领域的进展提供了一个全新的策略。

2.2.1　基因工程菌生产蛋白质

突变育种的遗传学操作在提高许多微生物蛋白表达水平中起了重要的作用，然而该方法常被认为是偶然事件，研究者不能控制其遗传学变化。重组 DNA 技术的出现改变了这种情况，可直接实现特殊的遗传学改造，也可以实现蛋白质产量的提高——而在突变育种研究中只能偶尔实现。虽然这些并不表明重组技术可以替代传统的突变研究，但重组 DNA 技术是菌株改良最适合的方法。在菌株改良中，传统的突变育种将继续起到一定的作用，因为突变育种时采用适当的筛选过程和适当的检测所需蛋白质的方法，经过“反复”突变法改良菌种，可以方便而且便宜地进行大量的试验。

重组 DNA 技术有很多种方法用于提高内源微生物蛋白的产量，这些方法包括：①将相关基因的附加拷贝引入微生物；②将相关基因的一个拷贝或多个拷贝引入微生物，在强启动子下控制表达，该法能成倍提高有益蛋白质的产量。但必须注意，无论以何种方式努力提高所需蛋白质的表达水平都不能危害正常的细胞功能，如果采用诱导型启动子，基因表达的时间可以调控，则可以将对正常细胞功能危害的可能性降至最低。

将自然条件下细胞内不产生的重组蛋白称为异源蛋白，采用重组的方法在微生物体内产生的蛋白质几乎都是异源蛋白。从特定的微生物菌种中分离一个基因/cDNA 序列，然后用重组的方法在相同种的菌体内表达基因产物，该方法被称为同源蛋白生产，在自然条件下宿主细胞也可以生产这种重组蛋白，但插入多拷贝的基因或改变启动子，则可以大大提高基因产物的产量或克服基因表达的许多问题。由同源蛋白生产的方法生产的商业化重组蛋白中，代表性的产品包括脂肪酶洗涤剂“Lipomax”和植酸酶“Natuphos”（第 12 章）。

2.2.2　大肠杆菌生产异源蛋白

用于生产异源蛋白的细菌中最常见的是大肠杆菌，这是由于传统上对原核生物的遗传学研究主要集中于以大肠杆菌作为模型系统，因此，对大肠杆菌的遗传学特性的认识比别的细

菌更清楚，目前已构建了很多可用的质粒（表 2.3）。

表 2.3　在大肠杆菌工程菌中控制重组蛋白表达时所使用的一些启动子

启　动　子	诱 导 方 式	注　　释
ara	培养基中添加树胶醛糖	快速诱导，紧密型调控，但受葡萄糖阻遏
cad	调整培养基酸性 pH 值	实现高表达水平，诱导剂便宜
lac	培养基中添加异丙基硫代-β-D-半乳糖(IPTG)；高温	低表达水平，在非诱导条件下弱表达
tac	培养基中添加 IPTG；高温	特性清楚，高水平表达，但在非诱导条件下弱表达
trp	培养基中添加吲哚丁酸	特性清楚，高水平表达，但在非诱导条件下弱表达
T7	培养基中添加 IPTG；高温	高水平表达，但在非诱导条件下弱表达

一些情况下，编码有益蛋白质的外源基因或 cDNA 可直接与大肠杆菌的一个完整或部分基因结合，表达融合蛋白；而另一些外源基因在细菌的控制因素、启动子和终止子等调控下转录，即直接表达。直接表达产生的蛋白质氨基酸序列与其天然来源氨基酸序列相同，而异源基因的融合表达蛋白通常必需经过化学或酶切以释放出天然蛋白质。目前，治疗学上应用的重要的异源蛋白几乎都是由大肠杆菌生产的，其中许多已在临床上使用，而一些正在进行临床试验。第一个用于临床的异源蛋白是大肠杆菌生产的人胰岛素，1982 年由英国、联邦德国、荷兰和美国管理权威机构首次批准它可以用于临床，其余的大肠杆菌产生的异源蛋白见表 2.4。此外，同完全抗体功能相同的部分抗体片段现在也已在大肠杆菌表达系统中得以生产，在本书后面的章节中列举了更多的例子进行详细介绍。

表 2.4　一些大肠杆菌生产的异源蛋白及表达水平

蛋　白　质	表达水平(占全细胞蛋白的比例)/%
生长激素抑制剂	<0.05
胰岛素 A 链	20
胰岛素 B 链	20
牛生长激素	5
人生长激素	5
α_1-抗胰蛋白酶	15
白细胞介素-2	10
肿瘤坏死因子	15
β 干扰素	15
γ 干扰素	25
牛凝乳酶原	8

由大肠杆菌天然合成的蛋白质大多数存在于细胞中，只有很少被分泌到细胞周质，还有少部分可分泌到培养基中，因此，大肠杆菌中表达的异源蛋白聚积在细胞质中，占全部细胞蛋白质的 25%以上（表 2.4）。科研工作者们已经在构建重组蛋白生产系统，在使外源蛋白能分泌到细胞周质或细胞外培养基方面作了很多努力，主要集中于异源基因与大肠杆菌内生基因信号肽的融合，使蛋白质分泌表达，而到目前为止成功的例子很少。因为重组蛋白的细胞外分泌合理地简化了下游的加工过程，所以是人们研究的目标。

1. 包含体的形成

大肠杆菌产生的异源蛋白具有极高的表达水平，在多数情况下，这些蛋白质聚集在细胞质内，形成不溶性聚集体，即包含体（IB）或折射体。包含体既不是蛋白质天然的形式也不是完全伸展形式，而是经部分折叠的中间体组成，可通过暗视野显微镜进行观察（特别是直径为 1μm 的二聚体），包含体主要由表达的异源蛋白（其中其他蛋白含量低于 15%，主要是 RNA 聚合酶）、大肠杆菌外膜蛋白和 rRNA 组成。大肠杆菌中重组蛋白形成包含体的原因

尚不清楚，最可能的形成因素包括：

① 重组蛋白在胞内高浓度的积累可能引起非特异性沉淀的产生；

② 没有足够的分子伴侣/折叠酶参与部分折叠中间体的聚集；

③ 由于胞内的还原态环境阻止了二硫键的形成；

④ 缺乏翻译后修饰酶，产生不稳定的（真核的）异源蛋白产物。

包含体的形成并不都是负现象，因为包含体密度很大，易于在低离心力下沉淀，利于快速和有效地提取蛋白聚集体，尤其是在细胞均质后的低速离心。包含体比细胞破碎后残余体沉淀快，包含体离心沉淀物经重悬，并在转速为 500～1000g 条件下，离心洗涤数次以减少沉淀中细胞物质。细胞碎片遗留物的存在对蛋白质产品是很不利的，原因有以下几点：

① 细胞壁相关蛋白酶/肽酶能降解产品；

② 细胞碎片可能阻塞用于纯化重组蛋白的层析柱；

③ 细胞膜中含有脂多糖（用于治疗学的蛋白质是不允许有的，第 4 章）。

包含体分离后，使用变性剂溶解聚积的多肽。变性剂包括尿素、盐酸胍、各种去垢剂和有机溶剂，并在碱性 pH 条件下温育。包含体一旦溶解，就应采用如透析、稀释或抽滤等方法将变性剂缓慢去除。适当的诱导条件可促进蛋白质复性为具有生物活性的构型。复性的适宜条件因蛋白质不同而变化，因而不能保证复性蛋白质的产量都很高，尤其是大蛋白正确复性为活性形式的确是一个复杂的过程。因此，许多高分子量蛋白质如抗体和Ⅷ因子在哺乳动物细胞培养系统中生产可能会更好一些。

有几种方法可在大肠杆菌中表达可溶性异源蛋白，其中一些方法适于所有类型的蛋白质（如辅因子的内含物，见下述），而有些方法只适于几种特殊的蛋白质，且成功率较低，这些方法包括：

① 通过试验确定最准确的表达系统：准确的宿主菌株、质粒和质粒拷贝数、启动子序列都影响着产品表达的水平以及产品聚积形成包含体的趋势。

② 所需蛋白质以融合蛋白进行表达：所需蛋白质与宿主细胞质中天然蛋白质（高溶解性的）融合表达能一定程度上防止包含体的形成。

③ 分子伴侣的共表达可提高异源蛋白的溶解度（见第 1 章）。

④ 需要辅因子的重组蛋白：可通过增加细胞内辅因子的产生量（或外部添加辅因子）以提高蛋白质的溶解度。

⑤ 在低于生长最适温度下培养重组细胞：将大肠杆菌的生长温度从 37℃降至 30℃以下培养，常可阻碍包含体的形成。

2. 大肠杆菌生产异源蛋白的其他特性

从理论上讲，大肠杆菌可以成为任何工业上有益蛋白质的来源。然而，利用遗传修饰的大肠杆菌作为一些蛋白质来源仍存在许多缺点（表 2.5）。正如前面讨论的，缺点之一就是形成包含体。

表 2.5　大肠杆菌生产异源蛋白的优缺点

优　点	缺　点
大肠杆菌遗传特性了解清楚	重组蛋白以包含体形式在细胞内聚集
已成功建立了适合的发酵技术	不能进行蛋白质翻译后修饰
能不受限制地生产重组蛋白	重组蛋白与公众理念相悖
经济前景很诱人	

另一个缺点就是大肠杆菌不能表达翻译后修饰的真核细胞重组蛋白。大肠杆菌不能使蛋白质（第 1 章）糖基化、酰胺化或乙酰基化，天然来源的真核蛋白正常情况下都经过翻译后修饰，而在大肠杆菌中生产则没有这种修饰，这样可能影响也可能不影响异源蛋白的生物活性。正常糖基化的糖蛋白 β-干扰素和白细胞介素-2，在大肠杆菌中生产时，尽管没有经过糖基化，但依然具有生物活性。然而糖基化作用是许多真核蛋白共有的特性，在一些情况下，不经过糖基化作用可能改变重组蛋白的生物学特性，尤其对于用于医疗学目的的蛋白质更值得注意。一部分碳水化合物或糖基化作用修饰的缺乏，很可能引起分子生物活性的修饰，改变其半衰期或免疫原性，从而使蛋白质在水溶液中溶解性降低和/或更易于被蛋白酶降解。

大肠杆菌生产重组蛋白也可能在 N 端添加一个特殊的氨基酸残基（甲硫氨酸），这是因为在大肠杆菌中通常翻译起始于 *N*-甲酸基-甲硫氨酸残基，虽然大肠杆菌菌体内具有最终去除附加氨基酸的去甲酸化酶，但是对于异源蛋白的加工，这种切除是无效的，因而重组蛋白 N 端甲硫氨酸的存在也可能会改变其生物活性。

3. 异源蛋白在除大肠杆菌外别的细菌中的生产

除大肠杆菌外，许多细菌都能用作表达系统。由于人们对这些菌的特性了解得不如大肠杆菌清楚，因而对它们的应用程度也比较简单。GRAS 级细菌的表达系统最吸引人，目前已经有许多蛋白质是由安全的食品级细菌（如乳酸乳球菌和谷氨酸棒状杆菌等）生产的（至少在研究水平上）。此外，由于杆菌可以天然分泌大量胞外蛋白（其中很多胞外蛋白在工业中很重要，第 11 章和第 12 章），人们还开展了在各种杆菌中生产重组蛋白的工作，已经做了很多试验研究它们的工业化培养，“Lumafast”（脂肪酶洗涤剂的商品名称）就是由杆菌（第 12 章）生产的重组蛋白。利用杆菌生产异源蛋白的缺点是杆菌易于合成高水平的、能降解异源蛋白的内源蛋白酶。此外，还有研究报道用链霉菌（革兰阳性的土壤微生物）生产多种异源蛋白生产，这些非病原的、特性相对清楚的微生物能大量分泌细胞外蛋白，然而，其中大多数重组表达水平是非常低的［通常为 mg/L 级（以发酵液计）］。

2.2.3 酵母菌生产异源蛋白

酵母细胞也可以作为主要的宿主生产异源蛋白，因为：

① 它们具有同大肠杆菌表达系统相同的优点；

② 酵母，如酿酒酵母是属于 GRAS 级的；

③ 许多酵母在传统的生物技术加工如酿酒和焙烤中起重要的作用；对于它们的发酵和操作已经积累了大量的技术经验和资料；

④ 酵母的分子生物学已经历了多年的科学研究；

⑤ 酵母细胞不同于大肠杆菌等原核细胞，它具有亚细胞器官，能进行翻译后修饰。

最早用于生产绝大多数异源蛋白的酵母是酿酒酵母，由于其在传统工业中的重要性，因而它是所有酵母中研究最清楚的，人们用重组 DNA 方法生产的第一个疫苗（乙型肝炎表面抗原，第 5 章）就是由酿酒酵母生产的。虽然已经有许多异源蛋白在酿酒酵母中成功地生产（表 2.6），而这个体系同时也存在很多缺点（表 2.7）。

① 异源蛋白的表达水平低，通常占细胞总蛋白的 5%以下，比在大肠杆菌中低很多；

② 许多由酿酒酵母生产和分泌的异源蛋白不是释放到培养基中，而是存在于细胞周质，

尤其是高分子量的异源蛋白，这使下游加工过程更复杂；

③ 虽然酵母系统能进行翻译后修饰，如糖基化作用，但应注意，蛋白质被修饰的水平和类型与它们天然来源所进行的修饰并不完全相同，这种翻译后修饰的变异可能会影响该异源蛋白的生物特性。

表 2.6　采用重组技术在酵母菌中（至少在研究水平上）生产重要的治疗用蛋白质

用于治疗学中的蛋白质	酵母菌表达系统
乙肝表面抗原 B	酿酒酵母，巴斯德毕赤酵母，多形汉逊酵母
流行性感冒病毒的血凝素	酿酒酵母
脑灰质炎，VP2	酿酒酵母
胰岛素	酿酒酵母
人生长激素	酿酒酵母
抗体/抗体片段	酿酒酵母
人神经生长因子	酿酒酵母
人表皮生长因子	酿酒酵母
α 干扰素	酿酒酵母
白细胞介素-2	酿酒酵母
人因子Ⅷ	酿酒酵母，裂变酵母
人血清白蛋白	酿酒酵母，多形汉逊酵母，乳酸克鲁维酵母
水蛭素	酿酒酵母，多形汉逊酵母
α_1-抗胰蛋白酶	酿酒酵母
组织纤溶酶原激活剂	酿酒酵母，乳酸克鲁维酵母
链激酶	巴斯德毕赤酵母
肿瘤坏死因子	巴斯德毕赤酵母
破伤风毒素片段 C	巴斯德毕赤酵母

表 2.7　酵母菌生产异源蛋白质的优缺点

优　点	缺　点
大多数酵母菌是安全的食品级的(GRAS)	重组蛋白通常表达水平较低
在许多生物技术应用中历史悠久	许多蛋白质分泌到细胞周质
发酵技术已被完整建立	重组技术生产的蛋白质与公众理念相悖
能实施重组蛋白的翻译后修饰	一些翻译后修饰的蛋白质与动物细胞生产的天然蛋白质差异很大

除最常用的酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）外，还有几种别的酵母也用于生产工业上有益的异源蛋白，包括：多形汉逊酵母（*Hansenula polymorpha*）、乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*）、巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）、裂变酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）、施旺酵母（*Schwanniomyces occidentalis*）和 *Yarrowia lipolitica*，在一些特殊情况下，与酿酒酵母相比，这些酵母表达系统可以提高糖基化特性。然而，酵母表达系统是否是最合适的异源蛋白表达系统仍存在争议。

2.2.4　真菌生产异源蛋白

丝状真菌作为异源基因表达的宿主，原因如下：

① 它们具有异源蛋白翻译后修饰的功能；

② 丝状真菌许多是 GRAS 级的；

③ 多年来被广泛地应用于工业化生产各种酶以及别的初级和次级代谢产物（如维生素、各种有机酸、抗生素和生物碱）；

④ 与酿酒酵母和大肠杆菌相比，丝状真菌能合成并分泌大量的蛋白质到细胞外培养基中；

⑤ 异源蛋白的胞外分泌简化了后序产品的纯化；

⑥ 已知一些工业菌株如黑曲霉等可天然生产 20g/L 发酵液以上的葡糖糖化酶；

⑦ 由于在工业中的重要性，这些真菌大规模发酵系统已经过长时期的发展和优化。

目前，大量工业和医药上重要的蛋白质已经在许多真菌菌种中进行了异源生产，最显著的是曲霉属（表 2.8）。通过将有益基因与真菌强启动子连接，如真菌淀粉酶启动子，从而使蛋白质产量最高，虽然这些蛋白质产物具有适当的信号肽序列，可以分泌到培养基中并具有生物活性，但表达水平却有些令人失望，已报道的真菌异源蛋白表达量为每升培养液几百毫克到 1g 以上。

表 2.8　在重组真菌系统中表达的一些工业上重要的蛋白质

蛋　白　质	生　物　体
人干扰素	黑曲霉，构巢曲霉
牛凝乳酶	黑曲霉，构巢曲霉
天冬氨酸蛋白酶(源于米根霉)	米曲霉
甘油三酸酯脂肪酶(源于米根霉)	米曲霉
乳铁蛋白	米曲霉，黑曲霉

具生物活性的重组（异源或同源）蛋白的低表达水平原因主要是由于真菌中天然蛋白酶高水平表达的结果。大多数丝状真菌可以产生大量的胞内和胞外蛋白水解酶，不同真菌产生的蛋白酶谱是不同的。人们通过经典的突变和靶基因失活技术已经构建了真菌低蛋白酶菌株，其蛋白酶水平比正常值低 5%，并已证明这些菌株更适于作为表达对蛋白酶敏感的重组蛋白的宿主。

在真菌（以及别的微生物）菌种中异源蛋白低产量的另一个原因也可能是由于密码子的偏好性，即一个菌种所使用的氨基酸特殊密码子与别的已知遗传信息的菌种相比是不同的。

人乳铁蛋白（human lactoferrin，hLF）是一个具有工业意义的蛋白质，已经在米曲霉和黑曲霉中成功地进行了表达。hLF 是一个分子质量为 78ku 的结合铁的糖蛋白，最早发现于牛奶，也存在于眼泪和唾液等体液中。对 hLF 确切的生物作用仍有争议，其功能包括促进肠道对铁的吸收、防止微生物感染以及由于铁的去除而抑制需铁微生物的生长。正常人乳中乳铁蛋白标准含量达 1g/L 以上，而牛乳中含量较低，这可能也是为什么母乳喂养的婴儿总是比牛乳喂养的婴儿身体好的一个原因，如果今后在饮食中添加重组乳铁蛋白则可以改变这种营养情况。

2.3　植物蛋白质

植物是很多具生物活性分子的传统的来源，其中最著名的是麻醉剂如鸦片。鸦片粗制品是由生长于亚洲（包括印度和中国）的特定种类植物未成熟的蒴果产生的乳白色分泌物，经干燥后而制成的。鸦片中最重要的医药成分是生物碱——吗啡，通常采用离子交换层析从鸦片粗制品中提取和纯化。

高等植物不被作为许多商业上重要蛋白质的生产者，因为：

① 许多工业重要蛋白质既可以在植物中合成，也可以在许多别的生物中合成，多数情况下，来源的选择应考虑技术和经济两方面的因素。

② 在自然界，植物的生长是季节性的，因此无法不断地提供材料来源。

③ 高等植物在生长过程中同时在液泡中积累排泄物，细胞分解这些排泄物时，产生大量的沉淀剂和变性剂，常使植物蛋白发生不可逆的失活。

尽管有以上的缺点，但是还有许多工业重要的蛋白质是从植物中获得的，如两个植物蛋白——应乐果甜蛋白和奇异果甜蛋白，它们被认为是最甜的天然产物，在食品工业中具有实际的或潜在的用途，详见后述（第 13 章）。此外，已在大麦中广泛应用的 β-淀粉酶就是由许多高等植物产生的，该酶在淀粉加工业（第 11 章）中起重要作用。然而，工业规模生产的植物蛋白在技术上最成熟的仍然是蛋白水解酶——木瓜蛋白酶（papain）。

木瓜蛋白酶，也被称为植物胃蛋白酶，源于 *Carica papaya* 的绿色果实和叶子的乳液，1937 年首次由美国 A. K. Balls 及其合作者分离并描述了其特性，它是一个半胱氨酸蛋白酶（第 11 章），活性位点包括一个主要的半胱氨酸残基，其还原态具有蛋白水解活性，是由 212 个氨基酸残基组成的单肽链，分子质量为 23ku，木瓜蛋白酶不仅是指纯化的酶，也用于指其乳液的干粗制品。木瓜蛋白酶在工业中具有广泛的用途，最有名的是用做肉的嫩化剂。胶原蛋白是动物主要的结构蛋白，占脊椎动物总蛋白的 1/3 以上，存在于组织和血管连接处而使肉强硬（第 11 章），木瓜蛋白酶在进行嫩化作用时，直接对胶原蛋白发挥蛋白水解酶活性。木瓜蛋白酶最适温度比较高（65℃），甚至可达 90℃以上。因为木瓜蛋白酶是热稳定性的，所以在食品煮制早期仍具蛋白水解活性。木瓜蛋白酶也应用于其他重要的工业加工中，如：

① 肉的嫩化作用；

② 动物去皮；

③ 饮料澄清；

④ 辅助消化；

⑤ 坏死组织去除剂（清理伤口）。

无花果蛋白酶是源于天然植物的另一个有商业价值的蛋白酶，通常是从热带树木的乳液中提取的，和木瓜蛋白酶一样，也是一个半胱氨酸蛋白酶，它表现出比木瓜蛋白酶更高的蛋白水解活性，而其在工业应用中则比较少。纯的无花果蛋白酶分子量约 25ku，“ficin”（无花果蛋白酶）不仅指纯品酶而且也包括乳液粗提物，木瓜蛋白酶和无花果蛋白酶在工业大规模应用时不要求高纯度的酶产品。植物酶，尤其是那些指定用于食品加工业的酶，必须源于无毒的、可食用的植物种类。

植物生产异源蛋白

重组 DNA 技术的优势不仅利于微生物也利于真核细胞的遗传学操作，目前有许多不同的异源蛋白和肽至少在研究水平上已在植物中进行了生产。植物系统的遗传学操作，通过引入外源基因或 cDNA 可以赋予物种新的功能或能力。新 DNA 序列可通过几种方式引入植物细胞，包括使用农杆菌作为载体或 DNA 直接注射到特定的植物细胞中，例如，使用这些技术可以操纵植物生产杀虫剂，一旦表达就可对植物起到保护作用。植物也可以用于生产有益的异源蛋白（表 2.9）。

表 2.9　在植物中利用重组方法生产的一些工业或医学上有用的蛋白质

蛋白质	原始来源	表达宿主	产量
α-淀粉酶	地衣芽孢杆菌	西红柿	占叶子可溶性蛋白的 0.3%
凝乳酶	小牛	西红柿	占可溶性蛋白的 0.5%
环糊精糖基转移酶	肺炎克氏杆菌	马铃薯	占可溶性块茎蛋白的 0.01%
红细胞生成素	人	西红柿	占可溶性蛋白的 0.003%
葡糖淀粉酶	黑曲霉	马铃薯	无报道
生长激素	鲑鱼	西红柿	占叶子可溶性蛋白的 0.1%
乙肝表面抗原	乙肝病毒	西红柿	占叶子可溶性蛋白的 0.007%
水蛭素	药用水蛭(一种水蛭)	油菜	占种子重量的 1.0%
β-干扰素	人	西红柿	占全蛋白的 0.00002%
溶菌酶	小鸡	西红柿	占叶子组织的 0.003%
植酸酶	黑曲霉	西红柿	占叶子可溶性蛋白的 14.4%
血清白蛋白	人	马铃薯	占叶子可溶性蛋白的 0.02%
木糖聚酶	热纤梭菌	西红柿	占叶子可溶性蛋白的 4.1%

注：在很多情况下，利用重组方法还没有进行商业化生产，Kusandi A 等（1997）为实践应用，采用改良的方法在转基因植物中生产重组蛋白；Biotechnol. Bioeng. 56（5），473～483。

采用重组 DNA 技术生产的蛋白质被利用的方法有两种：①蛋白质能从植物组织中提取、纯化（如果需要的话），然后使用；②重组植物组织能作为蛋白质的来源直接使用［如通常由微生物发酵生产的（第 12 章），添加于动物饲料中的酶在植物种子中表达，可直接用来饲喂动物］。

同样，植物生产的重组蛋白也具有优点和缺点（表 2.10），表中列的一些缺点反映的是与直接从天然植物中提取的蛋白质应用有关的问题，此外其余的缺点包括低的表达水平、与翻译后修饰有关的问题及关于植物重组蛋白的提取和纯化尚缺乏工业化试验等问题。在大多数情况下，有报道显示重组蛋白表达水平非常低（表 2.9），为了寻找有商业价值的生产方法，重组蛋白应该在植物组织中以一定水平、至少应占总的可溶性蛋白质（total soluble proteins，TSP）百分之几的水平积累。到目前为止，大多数重组蛋白的表达水平远远低于 TSP 的 1%。然而，植酸酶（14.4% TSP）和木聚糖酶（4% TSP）的表达水平高，它们的成功说明在植物中高水平表达是可以达到的。

表 2.10　转基因植物生产重组蛋白的主要优缺点

优点	缺点
产品投资更经济	通常表达水平较低
易于规模化生产	糖基化模型不同于动物的糖蛋白
可以利用已建立的实践/植物收获仪器/贮存等技术	缺乏工业化经验和植物组织下游加工的规模化试验数据
如果以含重组蛋白的植物直接作为蛋白质来源可消除下游的加工过程	植物生长的季节性和地理特性
可进行蛋白质产物的靶位生产/积聚在植物的特殊组织	在植物的液泡中存在有毒的物质
可实施翻译后修饰	已建立的可用的或可选择的生产系统较少

基于植物的表达系统（在程度和成分上）不同于动物细胞的糖基化模型，重要的是这种变化了的糖基化模型是否对重组蛋白产物有负面影响，对于医疗学上重要的糖蛋白这点尤为重要，因为改变了的糖基化模型可能影响产物的安全性和（或）功效。在植物糖蛋白的研究中发现特殊的低聚糖表位通常对哺乳动物具有高免疫原性，这表明一些应用于治疗学的哺乳动物糖蛋白如果在植物细胞中表达，很可能对动物具有免疫原性。

目前，对植物中重组蛋白的大规模生产缺乏工业化经验和试验，从应用角度讲，这也是植物生产异源蛋白的一个缺点。很多公司生产商品化蛋白质常采用微生物或动物细胞培养（或从整个动物组织中提取），他们重金投资于生产设备，而用于研究植物表达系统方面的投资太少了。此外，对于治疗学蛋白，权威管理机构已经认定植物表达系统可以生产安全的和有治疗学效果的产品。

尽管存在很多缺点，但仍有许多强有力的论据支持植物的重组表达系统。转基因植物一旦产生（可在安全水平表达重组产物），则上游程序的花费（也就是植物的生长过程）是很低的，只需要扩大农作物的播种面积即可提高蛋白质产量，蛋白质生产也将不再受昂贵的仪器和生产设备的约束，只需直接使用已有的收获设备进行收获。

在植物系统中重组蛋白的合成主要依赖于蛋白质的表达水平和所用植物的种类，上游程序（也就是生长）的成本估算比在大肠杆菌中合成便宜 10～50 倍，这是非常经济的，尤其是当蛋白质的价格对它本身很重要，而且应用中对其的下游加工要求很低的蛋白质（例如，植物经收获后直接作为重组蛋白来源，而不需任何纯化过程）。而对于那些需要进行重要的下游加工程序的蛋白质（如治疗用蛋白质，需要纯化到同质），则必须花费很多资金，下游加工程序的成本占总生产成本的 80%甚至更多。植物中重组蛋白的生产不必经过下游程序时，成本低于其他别的表达系统。

重组蛋白在特定的植物组织中的靶位表达能力也是植物异源蛋白生产的一个优势，这样可以降低蛋白质对植物的毒性并减少环境管理方面的问题（例如，蛋白质经过植物花粉而释放到通常环境中）。由于高等植物的天然种子价格便宜，它包含了大量的贮藏蛋白，种子收获后可以贮藏很长时间且不会引起蛋白质降解，而植物的绿色组织则通常在收获后迅速腐烂，因此蛋白质在植物种子中的靶位积聚尤其吸引人们的注意。绿色组织中的重组产物要求在收获后应迅速进行蛋白质的提取，或在制冷或冷冻条件下贮藏或收获。

植物中最早生产的转基因肽产品就是亮氨酸脑啡肽，是成功地将其 DNA 编码序列插入到一个种子贮存蛋白 2S 白蛋白的基因编码区生产而成的。2S 白蛋白家族是已知最小的种子贮存蛋白，分子质量为 12ku，这个家族源于一群结构相关的基因——都具有保守序列和可变序列，可变区的序列和长度都是可变的。生产亮氨酸脑啡肽的策略是用编码 5 个氨基酸的神经激素的 DNA 序列替换这个可变区序列，构建的 DNA 两侧是编码胰蛋白酶酶切位点的密码子，改建后的 2S 白蛋白基因经过表达，结果产生含亮氨酸脑啡肽的杂交贮存蛋白，然后经过胰蛋白酶酶切，亮氨酸脑啡肽被释放出来，可通过 HPLC 进行纯化。因为蛋白质产物两侧结合了胰蛋白酶酶切位点，纯化产物含有一个额外的赖氨酸残基；羧肽酶只水解肽/多肽 C 末端肽键，因此最后通过羧肽酶处理即可除去额外的赖氨酸残基。目前，许多多肽也已经在很多不同的植物种子中进行了表达。

2.4　动物组织作为蛋白质的来源

许多商业有用的蛋白质来源于动物，尤其是大量的治疗学蛋白质如胰岛素和血液因子，后面的章节中将详细讨论，在此只作简单介绍。利用屠宰场的设备对动物进行加工，非常便于大量收集作为蛋白质来源的特殊组织。

源于动物的蛋白质最出名的是胰岛素，它是由胰腺中胰岛的 β-细胞产生的多肽类激素，

治疗学上用于治疗胰岛素依赖性糖尿症（Ⅰ型糖尿病，见第 7 章）。直到 20 世纪 80 年代初从牛和猪的屠宰场得到的胰腺组织中获得了胰岛素，三头猪体的胰腺组织中得到的胰岛素量可满足糖尿病人约 10d 的需要，全世界糖尿病人数不断增加，每天对胰岛素的需求已远远超过了屠宰场来源的供应。现在，通过重组方法可以无限地提供胰岛素，人们不必再为此担心了。表 2.11 列出了一些从动物体直接提取的有商业价值的激素。

表 2.11　传统上由动物来源的一些工业和医学上重要的蛋白质

蛋　白　质	来　　源	应　　用
胰岛素	猪/牛胰腺组织	治疗 1 型糖尿病
胰高血糖素	猪/牛胰腺组织	胰岛素反向诱导的低血糖症
促滤泡素(FSH)	猪垂体	诱导动物超数排卵
	更年期妇女的尿液	治疗(人)生殖功能障碍
人绒毛膜促性腺激素	怀孕期妇女的尿液	治疗生殖功能障碍
促红细胞生成素	尿液	治疗贫血病
血液因子	人血浆	治疗血友病
多克隆抗体	人或动物血液	各种诊断和治疗学应用
凝乳酶(高血压蛋白原酶)	未断奶小牛的胃	奶酪制作

注：表中的许多蛋白质现在也已经通过重组技术生产。

大多数工业重要的蛋白质源于人或别的动物，目的是用于治疗学使用。关于这些动物来源蛋白质（特别是人源）用于治疗学的缺点之一就是未加工材料中可能存在病原菌，如很多血友病患者通过输入被人免疫缺陷病毒（human immuno deficiency virus，HIV）感染的血液而患获得性免疫缺乏综合征就是一例；另一个例子是牛海绵状组织性脑炎（bovine spongiform encephalitis，BSE 或疯牛病），世界各国的牛群都有发病。当动物组织作为蛋白质来源时，必须实施大量的预防措施，最明显的预防措施就是所用的动物组织只来源于无病动物。纯化有益蛋白质的下游加工程序也必须经过检验，检验结果应该表明采用的纯化步骤能清除起始材料中存在的病原菌。

许多病原菌，尤其是病毒类病原菌，具有显著的种的特异性，所以治疗学使用的从特殊动物种类获得的蛋白质，通常不对同一种类中别的动物使用，例如，用于牛超数排卵的纯的促滤泡素，通常源于猪的而不是牛的垂体腺体。

2.4.1　转基因动物生产异源蛋白

过去的多年中，在转基因动物领域已取得了令人兴奋的进展。起初试验的目的是为了努力提高很多动物的特性，如通过生长激素基因拷贝的染色体整合技术希望能使动物生长率戏剧性地提高；转基因动物的产生通常是将 DNA 直接微注射到卵中，而这种方法的成功率极低。这种“分子种植”的一个目的就是在动物中引入特殊的功能基因，从而获得令人满意的特性如更有效的饲料利用，提高生长特性或多产瘦肉。

转基因动物的另一个目的是使动物具有产生大量工业上重要蛋白质的能力，该技术已在小鼠、山羊、绵羊和牛体中获得了不同程度的成功，转基因动物成功的首例是生长激素高水平表达，但同时也显示出了一些与该技术相关的问题，人们发现生长激素长期高循环水平（严重超出正常生理范围）产生了一些不利的生理影响。许多具有治疗学价值的蛋白质高循环水平，几乎都对转基因动物正常代谢产生相似的副作用。特殊的动物组织也是异源蛋白表

达的靶位，如乳腺就是其中一个，通过外源基因在乳腺中靶位表达，产生的异源蛋白可以直接分泌到牛乳中，这样可与动物的循环系统自然分开。将外源基因与牛乳蛋白信号肽序列融合即可在乳腺中表达有益的遗传信息。如果构建好的外源 DNA 成功地注射到卵中，然后受精并灌输到代理母体内，接着胚胎生长发育成熟到最后分娩，外源 DNA 成功地整合到新生儿染色体中并表达，最终，获得的转基因动物能生产有益蛋白质并选择性地分泌到它的乳中。

20 世纪 80 年代中期首次报道了具治疗学潜力的异源蛋白的生产，即将人组织纤溶酶原激活剂（t-PA，第 5 章）在转基因鼠的乳液中进行生产，鼠乳清酸性蛋白是乳清中最丰富的蛋白，所以将酸性蛋白基因启动子上游调控序列与人 t-PA 的编码基因连接在一起构建的重组 DNA，注射到小鼠胚胎中而获得的转基因鼠，其乳液中就可以检测到具生物活性的 t-PA。

在转基因羊乳中也成功地高表达了具活性的人 α_1-抗胰蛋白酶（图 2.3 和第 5 章），在适合的转基因动物乳中生产重要的药学蛋白质是很有前途的（表 2.12）。除组织纤溶酶原激活剂外，许多别的异源蛋白也已经成功地在乳中进行了生产，这些生产系统与别的生产方法如动物细胞培养（下一节）相比，具有很多的优势，特征如下：

图 2.3　转基因羊“Tracy”和她的两只小羊的照片

Tracy 的乳中可以高表达具活性的人 α_1-抗胰蛋白酶

［照片经 Pharmaceutical Proteins Ltd.（UK）允许］

① 高产力。一只羊在典型的 5 个月哺乳期时，每天可以产生 2～3L 乳。如果重组蛋白的表达水平为 1g/L，那么一只羊每周可以生产 20g 以上的重组蛋白。

② 原材料易于选择。对原材料的要求只要动物可以产乳即可，商业中采用自动挤乳系统，在挤乳过程中，人们已经设计了最佳的卫生标准，因而只需要进行适当的设计改造即可。

③ 易于规模化生产。按照饲养程序可以扩大动物量。

表 2.12　在转基因动物乳中表达的一些治疗用蛋白质

蛋 白 质	生产动物	用　途	章　号
α_1-抗胰蛋白酶	羊	肺气肿（一些形式）	5
因子Ⅸ	羊	B 血友病	5
纤维蛋白原	羊	血液失调	5
抗血栓Ⅲ	山羊	血液失调	5
各种多克隆抗体	山羊	很多肿瘤包括体内肿瘤的检测	6
人血清白蛋白	母牛	血浆体积增大症	5

注：采用这种方法生产的几种蛋白质目前正进行临床试验，这些蛋白质的生化和生物技术在列出的章中介绍。

在转基因的动物乳中，与治疗学上重要蛋白质的生产相关的许多技术细节已经得到优化。尽管通常得到的蛋白质产值很高，但在一些报道中，蛋白质的产值低于 1mg/L，因而异源蛋白的产量变化较大。哺乳动物组织可以对合成的蛋白质进行广泛翻译后修饰，这种修饰的详细特点，尤其是糖基化模式，目前仍在研究中。

2.4.2 用动物细胞培养生产异源蛋白

动物细胞培养也是几种医学重要蛋白质的来源，事实上这些蛋白质都是用于治疗学和诊断学的。利用这种方法生产的最著名的是单克隆抗体、各种疫苗和干扰素（表 2.13）。在近 20 多年中，由于细胞培养技术可提高蛋白质生产，因而促进了人们研究和发展动物细胞操作和发酵方法的高潮。

表 2.13 通过动物细胞培养技术商业化生产的一些具药效的重组蛋白

蛋 白 质	生 产 细 胞	医 学 应 用
因子Ⅷ	CHO 细胞，BHK 细胞	血友病 A
因子Ⅸ	CHO 细胞	血友病 B
t-PA	CHO 细胞	心脏病发作
FSH	CHO 细胞	不孕症
促红细胞生成素	CHO 细胞	贫血症
β-干扰素	CHO 细胞	多样硬化症
几种多克隆抗体	杂交瘤细胞	防止包括肾移植排斥在内的各种移植排斥和肿瘤的体内定位

注：CHO，中国仓鼠卵巢；BHK，小鼠肾；t-PA，组织纤溶酶原激活剂；FSH，促滤泡素。

动物和微生物细胞的结构和生理学有许多不同之处。现在使用的微生物细胞发酵技术为动物细胞的成功培养奠定了基础。动物细胞没有细胞壁，与微生物相比更易受到物理性损伤，因而在培养时，发酵罐中通常具有一个改良的搅拌器，以减少由于搅拌器叶轮在旋转时产生的剪切力对细胞的损伤。如果采用气升式反应器，即通过将空气-CO_2混合物从底部通入反应器中（图 2.4），促进液体培养基在罐内的运动，这样也可以降低动物细胞的生理损伤。

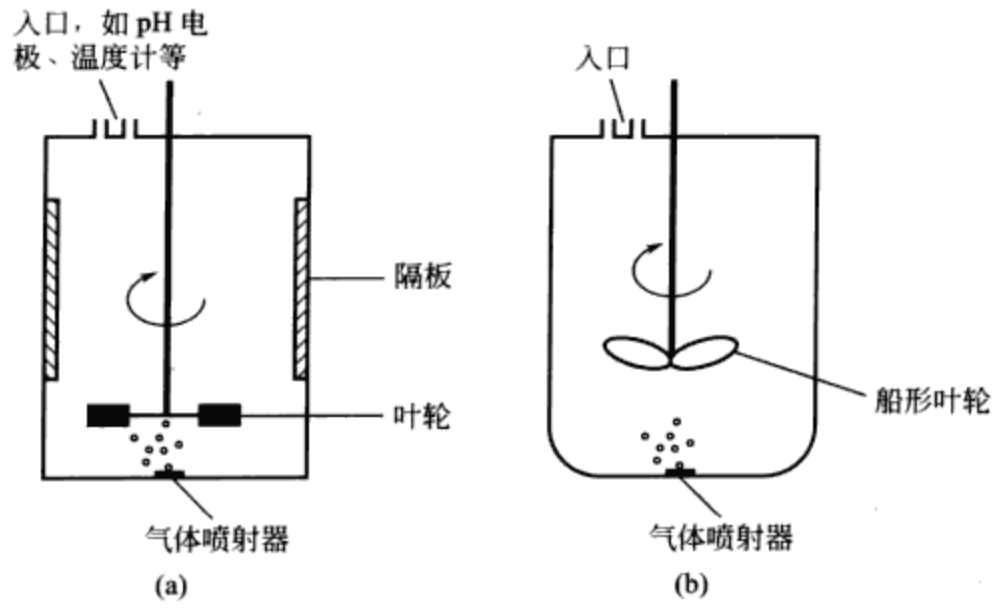


图 2.4 微生物细胞发酵罐（a）和动物细胞生物反应器（b）的结构图

动物细胞生物反应器与微生物发酵罐相比，结构有几点不同，尤其应注意的是：①使用船型叶轮（一些动物细胞生物反应器——气升式发酵罐——没有叶轮，而是使用空气-气体喷射作为培养基搅拌的方式）；②缺少隔板；③在生物反应器底部，内表面成曲形。这些改进的目的是为了减少脆弱的动物细胞在培养过程中受到伤害。注意各种附加的生物反应器配置在市场上也是现有的

此外，动物细胞与微生物细胞的一些别的不同之处也影响动物细胞培养和发酵设计，包括：

① 动物细胞的营养要求比别的微生物细胞更复杂；

② 动物细胞对氧需求低，比其他微生物生长缓慢；

③ 发酵时要求的接种量大。

动物细胞可分为贴壁依赖性细胞和非贴壁依赖性细胞，这也决定了它们的生长方式。贴壁依赖性细胞只在固体基质上生长，形成单层形式，并且表现出接触抑制。而非贴壁依赖性细胞生长不需要固体支持物。大多数已确定的细胞，以及转化细胞都属于后一类。两种细胞型在深层细胞发酵罐中生长时，贴壁依赖性细胞的培养必需黏附于适合的载体珠上。

单克隆抗体是由动物细胞生产的最有名的蛋白质，由于其独特的生物学特性，而且具有极大的诊断学、治疗学和制备价值，目前已建立了一系列完善的工业化生产流程。单克隆抗体生产最常用的方法是杂交瘤的培养，此外，许多别的哺乳动物细胞系也能装配和分泌单克隆抗体，目前抗体基因在哺乳动物非淋巴细胞系如中国仓鼠的卵巢（Chinese hamster ovary，CHO）细胞中已经成功地进行了重组表达。因此，高效的动物细胞表达系统可用于生产包括复杂的抗体在内的大量异源蛋白。

许多干扰素也已经采用细胞培养的方法（第 8 章）进行工业化生产。早在 20 世纪 50 年代晚期，首次发现干扰素后不久，它就被认定为抗病毒和抗癌药剂，应用于治疗学，多年来由于干扰素供应不足限制了其在临床中的应用，到 1980 年以前，干扰素都是直接从人的白细胞中获得的，产量最大限度约为 1%。20 世纪 80 年代早期，细胞培养技术的发展促进了纯干扰素的大量生产。如非重组 α-干扰素，通过细胞培养技术在 80001 生物反应器中进行了工业化生产；重组干扰素也通过细菌和哺乳动物细胞的发酵进行了生产。

前面已经提到，许多动物细胞系营养要求比较复杂，基本组织培养基包括碳水化合物、各种维生素、矿物盐和氨基酸，通常培养基中还要添加别的补充物，包括抗生素（防止污染微生物的生长）和血清，血清是基本营养物质，其成分不确定，其中胎牛血清是最有效的血清，添加量为终浓度 0.5%～25%。由于胎牛血清比较昂贵，因而动物细胞在大规模培养系统中，过去常采用小牛血清替代，近年来则选用成分更确定的血清替代物，如：牛血清白蛋白混合物、胰岛素和铁传递蛋白。虽然动物细胞培养基中有时必须添加血清或源于血清的物质，但这些复杂的蛋白质混合物和别的生物分子只可能使后续的纯化工作更复杂，而且添加血清的同时也增加了培养基被血液病原菌污染的风险。

2.4.3　昆虫细胞培养系统

利用昆虫细胞培养进行了许多重组蛋白的生产，通常使用杆状病毒表达系统，这个病毒在很多昆虫细胞都具有感染和复制的能力，并大量产生由病毒编码的结构蛋白即多角体蛋白，多角体蛋白的合成占寄主昆虫细胞所产生的全部蛋白的 50%。

利用该系统将编码有益蛋白质的基因与多角体蛋白启动子连接，用于生产异源蛋白。至于异源蛋白表达量范围一般为每升培养液 1～600mg 蛋白。杆状病毒的侵染力主要受昆虫细胞分泌途径的影响，由于大多数异源蛋白在细胞内高表达，因而为了克服这一问题，人们开始研究质粒表达系统，采用有效启动子和高拷贝量的质粒可以使蛋白表达水平大大提高（100mg/L）。昆虫细胞比较便宜并易于培养和保存（与动物细胞相比），同时也具有翻译后修饰的能力，因此，昆虫细胞系统虽然至今在工业中仍没有使用，但它将不断地发展并被利用。

2.5 直接化学合成

到目前为止医学和工业中使用的蛋白质都是以重组或非重组的方式在生物体系中合成，然后经过提取，必要时还要进行纯化，已使用的肽（主要在医学上）见表 2.14。肽通常在自然条件下产量极低，给大规模制备带来困难，甚至不可能制备。例如，最初研究下丘脑因子肽、促酪激素释放激素的特性的时候，需要 4000kg 的脑组织只产生 1mg 的纯品，而采用直接化学合成法可经济而大量地生产肽。最常用的合成方法（Merrifield 合成法，固相多肽合成）略述于信息框 2.1。

表 2.14 在医学上具潜在和实际用途的一些肽

肽	氨基酸数目	功能/生物活性
黄体化激素释放激素(LHRH)	10	调节刺激生殖腺激素的合成/释放，从而调节生育
脑垂体激素	9	促进子宫肌肉收缩(在分娩/诱导分娩时很重要)
抗利尿激素	9	促进肾对水的再吸收
血管舒缓激肽	9	抑制炎症
脑啡肽	5	缓解疼痛
血管紧缩素 II	8	调节血压
抗生素肽	多种	抗微生物活性

信息框 2.1 肽的化学合成法

肽的合成有多种方法，其中最常应用的是 Merrifield 固相多肽合成法，如图 2.5，它是通过依次将氨基酸加到被锚定在经修饰的聚苯乙烯珠表面的正在增长的链上。修饰珠含有起反应的氯甲基（$-CH_2Cl$）基团，首先单个氨基酸模块与二叔丁基重碳酸盐混合，形成一个叔丁醇醚碳酰胺（BOC）氨基酸。

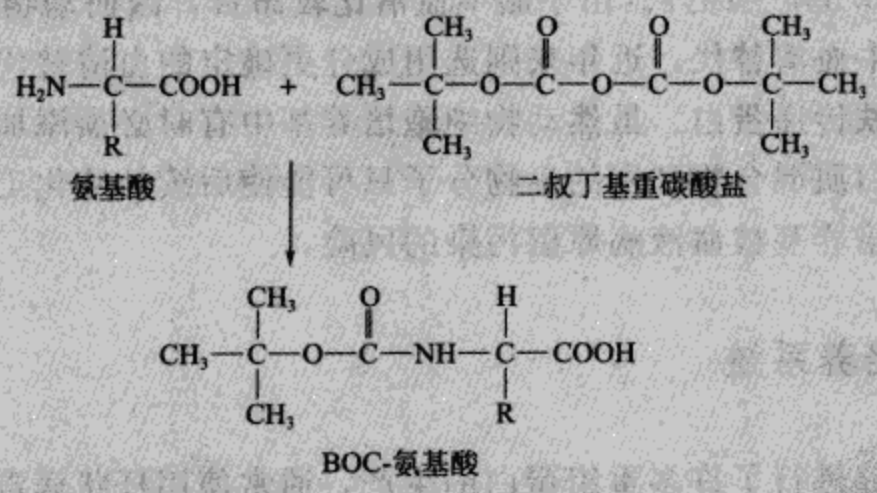


图 2.5 Merrifield 固相多肽合成法

BOC 基团保护了氨基酸的氨基，因而确保每个新的氨基酸是通过氨基酸的羧基加到正在增长的肽链上（第一步）；在碱性条件下第一个氨基酸与聚苯乙烯珠耦联，然后用三氯乙酸处理去除 BOC 基团（第二步）；接着在可促进肽键形成的耦联剂（DCC）的作用下，添加上另一个 BOC 保护的氨基酸（第三步）；最后氨基酸不断地被耦联而形成肽，值得注意的是肽的生成是从 C 端终止的；在所要求的肽合成后（下面以二肽为例），肽就从聚苯乙烯珠上释放出来（图 2.6）。商业生产中采用自动化计算机控制肽的合成，用于医药或别的用途中。

目前 Merrifield 方法适于合成含有约 60 个氨基酸残基的肽或小的多肽，由于考虑到技术难度及经济等因素，利用该法直接合成多肽难以实现。最近，人们又建立了一个化学直接合成法即自然化学连接法，可用于合成含约 120 个氨基酸残基的多肽，该法是通过采用适当的试剂，在中性 pH 的水溶液中，将 Merrifield 法合成的两条肽链化学连接，产生一条单多肽链。现已在实验室成功地合成了 200 个不同的蛋白质，这些蛋白质的 X 射线衍射和 NMR 分析，证明它们可以自发折叠为天然的（预期的）三维结构，同时也具有同天然分子相同的生物活性。

从经济或技术角度讲，对商业蛋白质进行大规模生产是否可以采用化学直接合成法至今仍不清楚。采用化学直接合成法合成大量商业蛋白质的优点包括：

① 基本消除通过病原体污染蛋白质产品而传播疾病的可能性；

② 提供改变氨基酸序列的蛋白质合成的又一种方法；

③ 提供合成含有非天然氨基酸/D-氨基酸蛋白质的方法，并将产生新的或有益功能的蛋白质；

④ 可以避免蛋白质合成时使用复杂的生物系统或大量昂贵的上游加工仪器；

⑤ 对于一般公众来说，该法生产的蛋白质比基因工程法更容易接受。

然而，该方法还有一些缺点：

① 目前通过这种方法能够生产的蛋白质大小仍受到限制；

② 其工业化试验几乎没有；

③ 大规模生产的经济情况还不清楚；

④ 不能实现与许多天然蛋白质相关的翻译后修饰。

信息框 2.1（续）

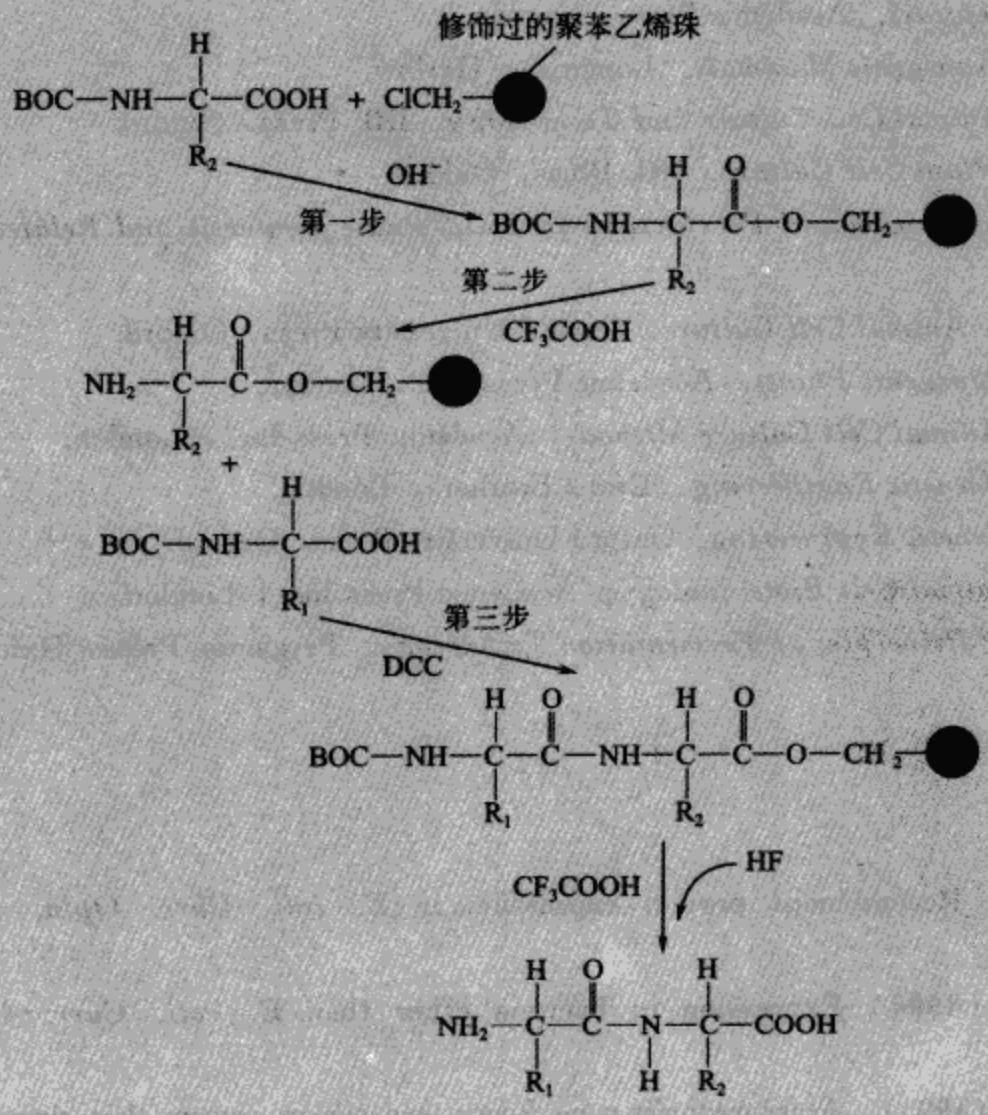


图 2.6

2.6 结　论

工业上有益蛋白质来源非常广泛，重组 DNA 技术的诞生更利于从很多不同有机体中生产各种有益蛋白质。然而，必须考虑的是技术的可行性并不能保证在经济上也是可行的。

许多微生物菌株可以天然高效地生产很多工业上重要的蛋白质，它们已经通过采用标准的筛选方法和突变技术进行了鉴定，尤其正确的是利用有机体大量生产的酶如淀粉酶和蛋白酶对菌株筛选鉴定的方法。

随着对控制基因表达和蛋白质合成因子的认识越来越清楚，科研工作者们已经可以从好多途径更有效地进行蛋白质生产，这或许对在新的宿主中生产治疗学和诊断学中具有高价值的蛋白质影响最大。目前，利用重组 DNA 技术可以大量生产这类蛋白质，尤其值得注意的是利用微生物生产系统。

2.7 进一步的阅读材料

图书

Alcamo, E. (1999) *DNA Technology*. Academic Press Inc., London.

Bernd, G. (1995) *Peptides*. Academic Press, London.

Bishop, J. (1999) *Transgenic Mammals*. Longman, Harlow.

Butler, M. (1996) *Animal Cell Culture and Technology*. IRL Press, Oxford.

Dixon, R. (1995). *Plant Cell Culture*. IRL Press, Oxford.

Epton, R. (1992) *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis and Related Technology*. Intercept, Andover.

Freshney, R. (2000) *Animal Cell Culture*. Oxford University Press, Oxford.

Kung, S. (1992) *Transgenic Plants*. Academic Press Inc., London.

Mather, J. (1998) *Animal Cell Culture Methods*. Academic Press Inc., London.

Morgan, S. (1997) *Genetic Engineering*. Evans Brothers, London.

Russo, V. (1998) *Genetic Engineering*. Oxford University Press, Oxford.

Spier, R. (1994) *Animal Cell Biotechnology*. Academic Press Inc., London.

Stanburg, P. (1995) *Principles of Fermentation Technology*. Pergamon Press, Oxford.

论文

细菌蛋白

Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10** (5), 411－421.

Billman-Jacobe, H. (1996) Expression in bacteria other than *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 500－504.

LaVallie, E. *et al*. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology* **11**, 187－193.

Middelberg, A. (1996) Large-scale recovery of recombinant protein inclusion bodies expressed in *E. coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6** (4), 225－231.

Schein, C. H. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/ Technology* **7** (11), 1141－1147.

Weickert, M. *et al.* (1996) Optimization of heterologous protein production in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 494－499.

酵母/真菌蛋白

Binnie, C. *et al.* (1997) Heterologous biopharmaceutical expression in *Streptomyces*. *Trends Biotechnol* **15**, 315－319.

Buckholz, R. & Gleeson, M. (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Bio/Technology* **9**, 1067－1071.

Cregg, J. *et al.* (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* **16** (1), 23－52.

Cullen, D. *et al.* (1987). Controlled expressed and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology* **5**, 369－375.

Kingsman, S. *et al.* (1985) Heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *In Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol 3, pp. 377－416, G. E. Russell, ed. Intercept, Andover.

Rallabhandi, P. & Pak-Lam, Y (1996) Production of therapeutic proteins in yeasts, a review. *Aus Biotechnol.* **6** (4), 230－237.

Smith, R. A. *et al.* (1985) Heterologous protein secretion from yeast. *Science* **229**, 1219－1224.

Sudbery, P. (1996) The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, . 517－524.

Van Brunt, J. (1986) Fungi: the perfect hosts? *Bio/Technology*, **4**, 1057－1062.

Van den Hombergh, J. *et al.* (1997) Aspergillus as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends Biotechnol.* **15**, 256－263.

Ward, P. *et al.* (1992) Production of biologically active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. *Bio/Technology* **10**, 784－789.

植物蛋白

Balls, A. K. *et al.* (1937) Crystalline papain. *Science* **86**, 379.

Fischer, R. *et al.* (1999a) Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Biol. Chem.* **380**, 825－839.

Fischer, R. *et al.* (1999b). Towards molecular farming in the future: using plant cell suspension cultures as bioreactors. *Biotechnol. App. Biochem.* **30**, 109－112.

Krebbers, E. and Vandekerckhove, J. (1990) Production of peptides in plant seeds. *Trends Biotechnol.* **8**, 1－3.

Kusnadi, A. *et al.* (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 473－484.

Moffat, A., (1992) High-tech plants promise a bumper crop of new products. *Science* **256**, 770－771.

Pen, J. *et al.* (1993) Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio/Technology* **11**, 811－814.

动物/昆虫蛋白

Datar, R. *et al.* (1993) Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/Technology* **11**, 340－357.

Finter, N. B. *et al.* (1984) Mass human cell culture as a source of interferons. *Lab. Technol.* **March-April 57.**

Fussenegger, M. *et al.* (1999) Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mamallian cells. *Trends Biotechnol.* **17** (1), 35—42.

Gordon, K. *et al.* (1987) Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/Technology* **5** (11), 1183—1187.

Houdebine, L. (2000) Transgenic animal bioreactors. *Transgen. Res.* **9**, 305—320.

Hu, W. -S. & Aunins, J. (1997) Large scale mammalian cell culture, *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 148—153.

Hu, W. S. Peshwa, M. V., (1993) Mammalian cells for pharmaceutical manufacturing. *Am Soc. Microbiol. News.* **59**, 65—68.

Jones, I. & Morikawa, Y. (1996) Baculovirus vectors for expression in insect cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 512—516.

Mc Carroll, L. & King, L. (1997) Stable insect cell cultures for recombinant protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 590—594.

Pfeifer, T. (1998) Expression of heterologous proteins in stable insect cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 518—521.

Rhodes, M. & Birch, J. (1988) Large-scale production of proteins from mammalian cells. *Bio/Technology* **6**, 518—523.

Van Brunt, J. (1988) Molecular farming: transgenic animals as bioreactors. *Bio/Technology* **6** (10), 1149—1154.

Weaver, J. F. *et al.* (1988) Production of recombinant human CSF-1 in an indusible mammalian expression system. *Bio/Technology* **6** (3), 287—290.

Wright, G. *et al.* (1991) High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technology* **9** (9), 30—34.

化学合成

Wilken, J. & Kent, S. (1998) Chemical protein synthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 412—426

(袁静　译　　王恒樑　校)

第3章

蛋白质的纯化与鉴定

3.1 引　言

从前面几章中可以看出，获得蛋白质的途径非常多。尽管来源广泛，纯化不同来源的蛋白质（天然的和重组的）所采用的整体方案和方法通常都是相似的（图 3.1）。对于任何一个特定的蛋白质，纯化方案细节的确定都有赖于一系列因素，这些因素包括：

① 正确选择原材料和定位目标蛋白（胞外或胞内）；

② 目标蛋白的表达水平；

③ 蛋白质的理化性质；

④ 纯化目的。

图 3.1　纯化蛋白质的通用方法

可以适当改变以适应不同蛋白质的纯化

样品来源将决定起始材料中杂蛋白的种类。如果蛋白质是胞内蛋白，需要根据原材料的类别（后文介绍）选择破碎细胞的方法。与胞内蛋白一样，胞外产物对所采用的纯化方案的初始步骤也有影响。蛋白质的表达水平对纯化方案也有影响。例如，纯化低水平表达的蛋白质时，很可能必须抽提非常大量的原材料，这就使得在随后的层析纯化之前必须进行高度浓缩。相反，如果蛋白质是以高水平表达的，初始的浓缩步骤很可能就是多余的了。蛋白质的理化性质对纯化方案的选择有非常大的影响。分离蛋白质是依据蛋白质理化性质的不同，如溶解性、大小、表面疏水性和荷电性。有时可以通过蛋白质工程的手段给重组蛋白附加标签，赋予这些蛋白质一些非常明显的理化特性，从而使这些蛋白质的分离更简单，关于这一点本章后面将会讨论到。

显著影响纯化方案的另一个因素是纯化的目的。如果只是纯粹学术的，纯化成均一成分通常是最重要的指标，而纯化所需要的步骤、纯化过程持续时间、成本、终产物回

收率则是次要的。如果纯化蛋白质是用于商业目的，必须考虑的就是经济和技术因素，而且通常蛋白质也只纯化到需要的最低标准（第 4 章）。对目标蛋白的量和纯度的要求会影响纯化方案的选择。而这些要求又与纯化蛋白质的目的有直接的关系。如果是学术目的，用于功能和结构研究，一般至多只需要几百毫克到 1 克纯化产物。如果纯化蛋白质的目的是为了应用，需要的量一般就会大得多（表 3.1），而且对纯度的要求因应用目的而异。

表 3.1　满足预期的学术或应用目的所必需的特定蛋白质的典型用量

目　　的	蛋白质需求量
质谱研究	纳克至微克水平
蛋白质序列分析/电泳分析	微克水平
常规功能研究/物理化学研究	毫克至克水平
与研究相关的应用专用的商业蛋白质	100smg[①]～100g(中度纯化)
体外诊断用商业酶/抗体	g～kg 水平(中度/高度纯化)
体内治疗用蛋白质:治疗低发病率疾病(如高歇病)	100g～10kg 水平(高度纯化)
体内治疗用蛋白质:治疗高发病率疾病(如糖尿病,血友病)	10kg～100skg[②]水平(高度纯化)
大量工业酶	>1000kg 水平(通常不纯化)
大量食用的奶源蛋白	>100000kg 水平(纯度因制备方法而不同)

① 应为 100mg，原著可能有误——译者注。

② 应为 100kg，原著可能有误——译者注。

蛋白质的检测和定量

对于任何蛋白质的纯化和鉴定来说，能够定量测定总蛋白的浓度和靶蛋白的含量都是必不可少的前提条件。测定生物样品中蛋白质浓度的方法有很多，表 3.2 列举了最常用的一些方法以及这些方法的原理、优缺点等。选择分析方法的依据包括对灵敏度的要求和样品中存在的干扰成分，在一定程度上还取决于个人偏好。尽管很难一概而论，但检测 280nm 下的吸光度和 Bradford 方法可能是最常用的方法。

可以采用生物分析和免疫分析两类常用方法中的一类对目标蛋白进行特异地定量测定。顾名思义，生物分析即监测靶分析物（蛋白质）的生物活性，具体地说就是定量测定对生物系统施与一个刺激因素（如靶蛋白）后所引发的反应。“生物系统”通常可以是满足实验需要的微生物、动物或植物细胞或组织、动物体或植物体。表 3.3 列举了一些特异的生物分析例子。

生物分析通常是相对的，因此除了被检样品外还需要标准品（如含有已知量靶分析物的样品）。每毫克的标准品定义了确定的生物活性单位，而且这些标准品一般都是商品化的。直接对比被检品和标准品所引起的反应即可确定被检品的活性。

生物分析虽然能直接定量测定目标蛋白的确切生物活性，但是分析过程可能成本很高，耗时可能很长（数小时至数天）。而且由于测定的反应是由生物系统产生的，结果中经常不可避免地存在很大程度的不精确性。当然，生物分析所测量的反应也应当是只有目标蛋白可以引发的。

酶代表蛋白质中一个重要的家族，至今仍是科学研究的热点。通常将催化蛋白与它的底物在限定的环境条件（温度和 pH）下共温育特定的时间，从而测定酶的活性。监测底物消耗速率或产物生成速率可以计算催化活性。最常使用的酶的活性单位有两种（二者是相关联的）：

表 3.2　检测和定量生物样品中的蛋白质常用的几种方法

方　法	灵 敏 度	作用方式	优　点	缺　点
280nm 下光吸收（UV 方法）	0.02～3.0mg/ml	芳香族氨基酸残基的 R 基团在 280nm 有吸收	简便快速，对样品无破坏性	灵敏度低，相同浓度的不同蛋白质会产生不同的光吸收值
205nm 下光吸收（远 UV 方法）	1.0～100μg/ml	肽键在此波长有光吸收	简便快速，灵敏，对样品无破坏性	并非所有 UV-Vis 分光光度计都能测量 205nm 光吸收，通常使用的缓冲液在该波长也有吸收，如果在低强度（＜10mmol/L）使用就不会产生此问题
酸性消化（茚三酮法）	20～50μg	蛋白质与硫酸在 100℃温育水解成氨基酸，之后氨基酸与茚三酮反应产生在 570nm 有光吸收的衍生物，从而测定氨基酸的量	灵敏，酚/芳香化合物对分析无干扰	使用有毒化学品（在 100℃使用硫酸），分析时间长（可达 20h）
二辛可宁酸（BCA）法	20～100μg/ml	含铜试剂被蛋白质还原时与二辛可宁酸反应产生在 562nm 有最大吸收的衍生物	灵敏方便，较其他方法更抗分析干扰	试剂昂贵。背离精确的分析程序（如持续时间、温度、试剂浓度）可能导致不同的结果
双缩脲（Lowry）法	1～10mg/ml	含铜试剂与蛋白质定量反应产生在 550nm 有最大光吸收的产物	试剂便宜，容易配制。较其他方法不易受干扰	灵敏度低
Bradford 方法	150～750μg/ml	依据考马斯亮蓝 G-250 染料在一定 pH 下与蛋白质可逆结合。在 595nm 有最大光吸收	中等灵敏度，操作简便快速	碱性 pH/缓冲液干扰分析。受去污剂干扰（如 SDS）
干重法	最低 2～4mg /样品	含蛋白质样品 106℃加热 4～6h，称干重	方法简单，不需要化学试剂	灵敏度低，样品中不能含有不挥发的非蛋白物质
发射荧光法	5～50μg/ml	依据蛋白质中芳香族氨基酸残基的荧光性	灵敏简单快速，对样品无破坏性	相同浓度的不同蛋白质由于芳香族氨基酸残基含量的不同可能产生不同的光吸收
Hartree-Lowry 方法	30～150μg/ml	铜与磷钼酸/磷钨酸化合物与蛋白质定量反应，在 750nm 有最大吸收	灵敏度高	费力，容易受去污剂和交联剂干扰
结合银法	150ng～20μg/ml	依据蛋白质与银离子结合	灵敏度极高	交联剂、去污剂和还原剂干扰分析
三氯乙酸沉淀法	依所用检测方法而不同	在蛋白质样品中加入三氯乙酸沉淀蛋白质，重悬蛋白质用上述方法之一进行分析	常常能在定量之前从样品中去除干扰剂（三氯乙酸不能沉淀的）	费力

表 3.3　设计检测和定量目标蛋白的生物分析实例

蛋　白　质	生物分析说明
白细胞介素 2	促进激活的 T-淋巴细胞增殖的能力
α 干扰素	抑制某些病毒的细胞病变效应的能力（如疱疹性口炎病毒对某些人细胞系）
粒细胞集落刺激因子	促进某些动物细胞系增殖的能力
肿瘤坏死因子	诱导对某些动物细胞系细胞毒性效应的能力
促红细胞生成素	刺激 TF-1 动物细胞系增殖的能力
多肽抗体	抑制不同指示微生物生长的能力

① 1 个酶活性单位（U）是指在特定的反应条件下每分钟催化 1μmol 底物转化所需要的酶的量（如果每个底物分子中酶促反应的键并非只有 1 个，就是催化底物中 1μmol 有关基团转化的酶量）。换个角度说，1 个酶活性单位（U）是指在一定的反应条件下每分钟催化生成 1μmol 产物所需要的酶的量。

② Katal（kat）表示的是酶活性的 SI 单位。1 Katal 定义为在特定的反应系统中反应速率提高 1mol/s 的催化活性。

酶分析可以直接检测和定量具有催化活性的蛋白质的生物活性。但是，一般认为酶分析并不是真正的生物分析，因为酶的底物不是“生物系统”。

利用免疫分析（第 9 章）也可以对溶液中的蛋白质进行检测和定量，但前提条件是必须能够得到被检蛋白质的抗体。免疫分析具有很多优势，如特异性强、灵敏度高、分析周期短、易于自动操作等。免疫分析的主要缺点是它不能测定蛋白质的实际的生物活性。对蛋白质进行修饰（如不完全水解或变性）可能使其降低或丧失生物活性，但只要没有破坏蛋白质与抗体结合的特定结构域的三维结构，就不会影响免疫分析的结果。因此多数情况下还是优先选择直接分析蛋白质的生物活性对其进行检测和定量。但如果由于技术或成本的原因活性分析方法不适于常规使用，蛋白质纯化过程中就需要采用免疫分析的方法进行检测，但至少对纯化终产物进行生物分析，如果可能的话，还应在纯化的关键步骤之后进行生物分析。

3.2 蛋白质的初步回收

任何纯化程序的初始步骤都需要从原材料中回收蛋白质。这一步骤复杂与否很大程度上取决于目标蛋白是胞内产物还是胞外产物。微生物或动物细胞发酵产生的许多蛋白质都是分泌在培养基中的，对于这类初产物的回收，需要通过过滤或离心从发酵液中去除完整细胞，目标蛋白保留在无细胞培养液中，浓度通常都很低。

对于发酵产生的胞内目标蛋白，从培养液中收获细胞后，需要将细胞重新悬浮在缓冲液或者水中，使细胞充分裂解。一般情况下轻轻搅动就可以获得黏稠的细胞裂解悬液，但偶尔也需要更剧烈的机械混匀的方法。这样的黏液再重新悬浮，但体积要比收获细胞的发酵液的体积小。减少体积的目的是使随后的纯化过程的操作更方便。

动物或植物组织的天然蛋白质多数是位于细胞内的。加工这些材料的最初步骤显然是收集所需要的合适的组织，例如，收集脑下垂体提取纯化卵泡刺激素和黄体化激素等；收集血液纯化各种血蛋白；收集肝、肾等内脏可以纯化各种酶和感兴趣的其他蛋白质。如果原材料收获后不立即进行纯化可以冰冻保存。

3.2.1 细胞破碎

如果需要的蛋白质是胞内蛋白，收集原细胞或组织后首先进行破碎。大多数哺乳动物细胞或组织相对容易破碎。动物细胞不像细菌或植物细胞，不具有起保护作用的细胞壁。多数技术都是物理性破坏细胞膜。一个熟知的例子是 Potter 组织匀浆器，在转动杆和盛组织的管状容器内壁之间产生剪切力，从而达到破碎目的。

破碎动物细胞的其他方法还有渗压休克和反复冻融。通过渗压休克破碎需要将细胞悬在高渗透压的缓冲液（如含 15%～25%蔗糖的缓冲液）中，这样可以使水由细胞内渗透到蔗糖介质中，一定时间（1h 或更少）后细胞再转移到弱缓冲液或蒸馏水（即低渗透压溶液）中，水就会重新流回到细胞内，常常导致质膜破裂。顾名思义，反复冻融需要在冷冻细胞后再进行融化。如果必要的话可以重复进行冻融循环。在冷冻的过程中如果细胞内有冰晶生长会导致质膜损伤，从而促使细胞破裂。这种方法使用不广泛。

植物组织的有效匀浆更具挑战性，主要是由于植物细胞有细胞壁。通常采用物理手段破碎植物细胞，利用快速转动的刀片更容易使植物组织匀浆化。常用的是韦林搅切器（设计上有些类似于家用食物搅切器）。这种方法也可以用来破碎动物组织。

3.2.2　微生物细胞破碎

微生物细胞壁的存在使微生物细胞的破碎也很难。尽管如此，还是有许多非常有效的办法可以破碎大量的微生物样品（表 3.4）。像超声或溶菌酶处理这样的破碎手段，由于对仪器设备的要求或者是成本的原因，通常只适用于实验室规模的操作。通过化学手段大规模破碎细胞已经有一些成功的实例，使用的化学方法包括各种去污剂和抗生素，有机溶剂如甲苯或丙酮，碱性条件处理或使用离液剂如尿素或胍。

破碎微生物细胞的一些化学、物理和酶学方法如下。

①化学处理：去污剂、抗生素、有机溶剂（如甲苯、丙酮）、离液剂（如尿素、胍）。②暴露于碱性条件。③超声。④匀浆。⑤在研磨剂（通常是玻璃珠）作用下搅动。⑥溶菌酶处理。

使用去污剂提取蛋白质的操作在许多实例中非常有效，但是也有许多缺点。去污剂的作用方式主要是溶解细胞膜。离子去污剂如十二烷基磺酸钠比非离子去污剂如聚山梨醇酯更有效。使用去污剂的主要缺点是去污剂容易引起蛋白质变性和沉淀，这显然限制了它们的应用。许多其他化学方法包括使用各种有机溶剂或在碱性条件下温育也不能避免同样的缺点。此外，即使所使用的化学试剂对蛋白质没有负面作用，但它们的存在也可能对后续的纯化步骤有不利影响（如去污剂的存在可能抑制蛋白质与疏水作用柱结合）。另外，如果终产物中存在这些试剂，即使是痕量的，由于诸多原因也不能接受。使用去污剂破碎细胞的方法有许多成功的实例，如在大规模提取和纯化胆固醇氧化酶时就是使用 Triton 使诺卡菌细胞可通透的（第 9 章）。

机械方法如匀浆或剧烈研磨常常能对微生物细胞（和某些动物或植物组织）起到很好的破碎效果。匀浆时细胞悬液在非常高的压力作用下通过一个内径非常窄的小孔，从而产生非常强的剪切力，而当悬液穿过孔径流出时，压力又几乎在瞬间降到常规大气压，强的剪切力和随后压力的迅速下降是对破碎细胞非常有效的作用力，可以使大多数微生物细胞崩解（图 3.2）。多数情况下，一次匀浆就可以使足够的细胞破碎，但有时也可能需要匀浆两次或三次。

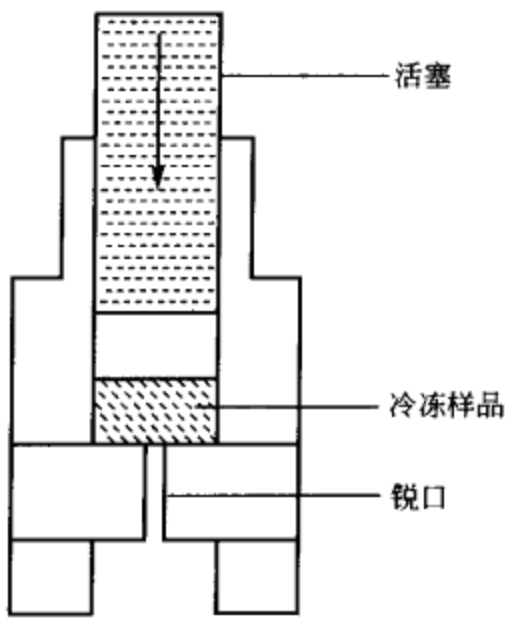


图 3.2　细胞匀浆器图例
示例的是常规破碎微生物细胞、一些动物或植物组织的众多仪器中的一种

早在20世纪50年代就已经发明并开始应用原型匀浆器，如今设计上已经有了许多改进。有效的制冷系统的添加最大限度地抑制了蛋白质的变性（由于匀浆过程中产生的巨大热量使得变性不可避免）。现在已经有能处理大量细胞悬液的匀浆器，其中一些可以在1h内有效处理数千升的悬液。

在实验室水平或工业生产规模常用的能有效破碎微生物细胞的另一个方法是在玻璃珠的作用下搅动细胞。微生物与一定数量的直径为0.2～0.3mm的玻璃珠放在研磨器的腔中，然后剧烈摇动或搅动珠子与微生物的混合物，使珠子和微生物细胞之间发生强烈撞击，也使得细胞在转动的珠子之间发生碾磨，所有这些力促使大多数微生物细胞有效破碎。操作参数如细胞和珠子的比例，搅动速率和搅动时间都可以调整以使所处理的特定的细胞达到最佳破碎效果。实验室系统可以在几分钟内完成数克微生物细胞的匀浆，工业生产规模的珠研磨系统每小时可以处理超过1000L的细胞悬液。制冷系统通过驱散研磨过程中产生的巨大热量而最大程度地保留了蛋白质的活性。

3.3 去除完整细胞和细胞碎片

匀浆步骤完成后产生的细胞碎片和残留的任何完整细胞都可以通过离心或过滤除去，正如前面提到的这些技术也可以在纯化细胞外蛋白的初始过程中用于从培养液中去除完整细胞。

3.3.1 离心

间歇式（固定体积）离心机一个旋转循环最多可以处理几升的样品，因而一般只局限于实验室规模的操作，工业生产规模的蛋白质纯化一般要处理几百升或几千升的粗提物，工业规模离心通常使用连续流离心机，匀浆液连续泵到离心机中，澄清液被连续收集。定期停转离心机手工去除沉淀物，就可以去除离心腔中沉积的固体。但新型连续流离心机在设计上都装有外周喷嘴，收集的固体可以连续排出，或者通过一个合适的排出阀使沉淀物间断排出。可以买到的连续流离心机有多种不同的设计，其中包括碟式离心机、空杯离心机和篮式离心机等三个基本类型。间歇式离心机在离心力大约为5000g时离心15min或更短的时间可以使多数微生物细胞沉降。有效去除细胞碎片需要更强的离心力和更长的离心时间，典型的是10000g离心45min。

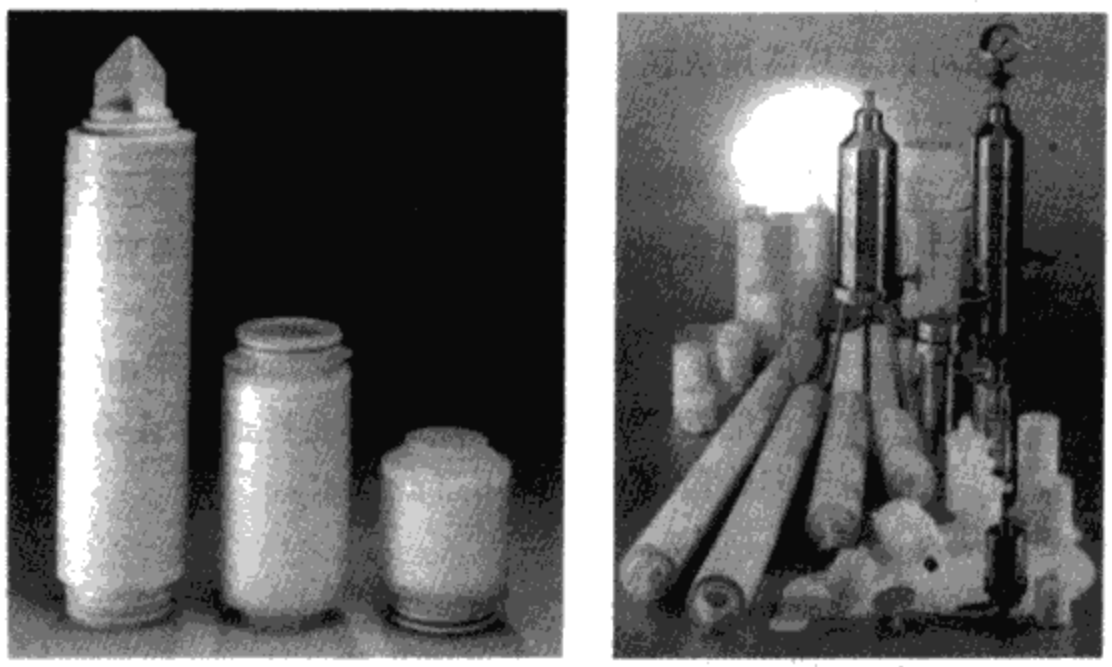
尽管间歇式离心机可以达到更大的离心力，但现在的连续流离心机产生的重力足以有效处理高流速的样品，典型的可以达到大约每小时数百升。无论是实验室规模还是工业生产规模，离心依然是有效分离细胞和细胞碎片的首选方法。但是诸多因素，尤其是高的仪器投入和运行费用，促使研究收集细胞和细胞碎片的替代方法，应用最普遍的是过滤。

3.3.2 过滤

过滤可以从溶液中去除细胞和细胞碎片。深层滤器或（更普遍）膜滤器都可以使用。深层滤器由随机定向的纤维（一般是玻璃纤维或纤维素纤维）构成，这些纤维形成不规则的管

网或筛状结构。这样的滤器不仅将颗粒保留在表面，滤材深处也有颗粒。深层滤器有时用于从发酵液中去除完整细胞，对此本章后面有所讨论。这样的滤器还可以用来从溶液中除去或减少细胞碎片、变性蛋白质聚集物或其他沉淀物。

膜过滤也称微过滤，使用的是膜样片状聚合物质如醋酸纤维素、硝酸纤维素、尼龙或聚四氟乙烯（Polytetrafluoroethylene，PTFE），膜上有非常小的孔。孔径一般在 0.02～10μm 之间。孔直径为 0.2～0.45μm 的膜滤器将保留所有微生物细胞。颗粒或细胞只保留在滤器表层的表面或内部。准备过滤的材料在一定的压力下通过过滤系统，以获得满意的流速。采用膜过滤从溶液中去除细胞和细胞碎片变得越来越普及。这种方法既有效，设备要求又不高。这种滤器一般都是弹药筒形，但也可以是平的碟形（工业用滤器多数是筒形）（图 3.3）。将矩形滤膜放在相同大小的支撑网上，然后折出褶皱，两个末端粘在一起形成圆柱置于塑料中心柱和对滤膜本身起物理保护和支撑作用的外层结构之间。打褶的目的是为了在紧凑的面积内增加过滤表面积。这样的滤器一般都是不锈钢外壳。



(a)　(b)

图 3.3　滤器图例

（a）一套筒式滤器；（b）一套滤器和它们的不锈钢外壳。外层的塑料支撑网保护打褶滤膜（照片承蒙 Pall Process Filtration Ltd. 允许使用）

膜过滤系统的主要缺点之一是容易堵塞，这会导致流速急速下降，阻塞也会导致过滤系统内压力增加，从而潜在破坏滤膜的完整性。但是现在多数滤器都可以耐受相对高的压力。

添加适当的预过滤系统总是能提高滤器的有效过滤使用周期并维持通过主滤膜的较高的流速。因而发酵液或匀浆液可以先用深层滤器过滤，流出液再经过膜滤器。另一个方法是使用 2 个或 3 个膜滤器，膜的孔径不一，按大小依次连接。这样的系统在工业上应用很普遍，工业使用微过滤以使流出液无菌。

微过滤经常用于对蛋白质溶液进行除菌。使用孔径绝对是 0.2μm 的滤膜可以完全去除微生物细胞。滤膜可以分为完全滤膜或不完全滤膜，完全滤膜保证可以去除大于滤膜标示孔径的全部颗粒，也就是说这种滤膜的阻滞效率是 100%，而不完全滤膜的阻滞效率可能达不到 100%，尽管这种滤膜比前者要廉价得多，但是要求严格的操作还是不要使用，如除菌操

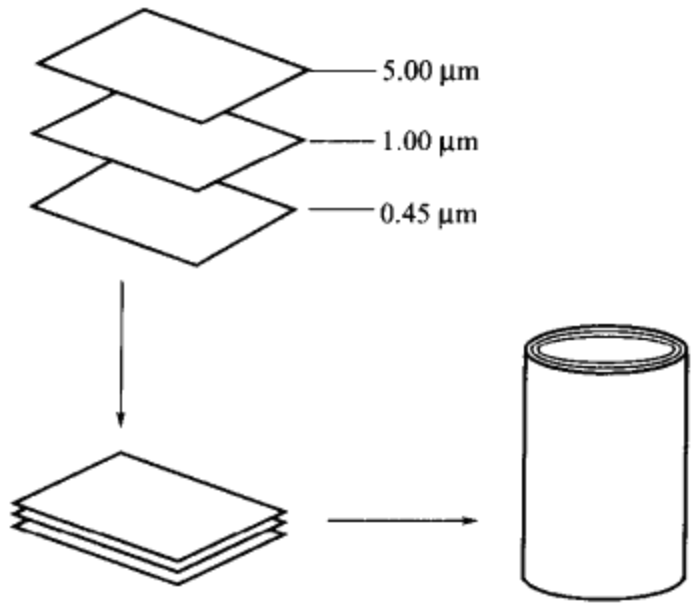


图 3.4 有 3 层不同孔径滤膜的新式筒式滤器示意图

作。实验室规模的除菌操作通常使蛋白质溶液直接通过 0.22μm 滤膜就可以达到目的，而工业规模的则要求溶液或者悬液通过由孔径依次为 1μm、0.45μm、0.2μm 的滤膜组成的过滤系统。依次使用 5μm 和 1μm 滤膜，再附加 0.45μm 滤膜可以降低微生物水平（生物负载）。逐次降低滤膜孔径能够延长小孔径滤膜的使用寿命。

许多新式过滤系统都是在一个单一的弹药筒式系统中整合了几个不同孔径的滤膜（图 3.4）。例如，预滤器层、两个不同孔径的膜滤器和一层支撑筛网挨层依序叠放，折出皱褶并将两头连在一起形成圆柱状过滤筒。在一个过滤系统中，一个这样的滤器可以替代 2 个或 3 个单孔径滤器。现在大多数筒式滤器都可以重复高压灭菌，或在线蒸汽灭菌，并且可以在较高的温度（70～75℃）下使用相当长的时间。

为了确保其有效性，需要经常检查滤膜的完整性，包括在使用之前和使用之后。最常使用的检查膜完整性的方法有双点检测法和持压检测法，两种方法都有赖于监测增压空气对过滤系统的效应。

虽然多数过滤介质都是相对惰性的，但是一些蛋白质或其他分子由于静电作用、疏水作用或其他作用吸附于过滤介质的可能性还是存在。这种可能性通常必须经过直接实验确定。总之，在蛋白质纯化过程中的许多阶段都可以应用过滤技术：

① 实现完整细胞从发酵液中的分离；

② 细胞破碎后去除完整细胞和细胞碎片；

③ 在纯化过程的后期减少或完全消除产物中的微生物。

有时离心也可以替代过滤达到同样的分离效果。虽然离心是分离的传统方法，但过滤的应用正在增多，尤其是在工业生产中。过滤之所以越来越普遍，主要是因为其设备成本投入少而且运行成本低，另外不稳定蛋白质失活降低。不稳定蛋白质可能被连续流离心过程产生的剪切力或因产生泡沫而破坏。相比而言大多数过滤系统比离心过程实际耗时更短。本章后面将讨论到另一种形式的过滤——超滤，超滤可用于蛋白质溶液的浓缩。

3.3.3 双水相分离

双水相分离技术可用于从溶解的蛋白质中分离完整细胞或细胞碎片，也可以对蛋白质进行一定程度的纯化和浓缩。虽然双水相分离技术在实验室和试点工厂已研究多年，但在工业生产上并未得到广泛应用，主要原因是对这项技术在分子水平是如何工作的缺乏了解。

双水相分离技术的原理是许多水溶性（水性）聚合物彼此或与高离子强度的盐溶液是不相容的，因而，如果一种这样的聚合物与盐溶液或与另一种（不相容的）聚合物混合，经过一段时间会形成两相。这样的分离系统可以用来从细胞碎片或其他杂质中分离蛋白质，碎片分配到下层相，该相极性更强密度更高，而可溶性的蛋白质则倾向于分配到上层相，该相极性更弱密度更低。之后将两相分开就可以有效分离细胞碎片和溶解的蛋白质。

应用最普遍的聚合物是聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG，乙烯分子由醚键连接形成的聚合物）和葡聚糖（重复的葡萄糖残基通过α1→6键连接形成的聚合物，又称“右旋糖苷”，图 3.5）。应用最普遍的聚合物-盐系统是聚乙二醇和磷酸盐（一般是磷酸钠盐或钾盐）系统。如果 PEG 和葡聚糖溶液与细胞匀浆液在适当条件下混合，蛋白质成分分配到上层 PEG 相，而细胞碎片沉积在下层葡聚糖相。通过这种方法经过较长的时间可以实现有效分离。如果是 PEG 和磷酸盐混合系统，蛋白质倾向于聚积在上层富含 PEG 相，而碎片聚积在下层富含磷酸盐相（图 3.6）。

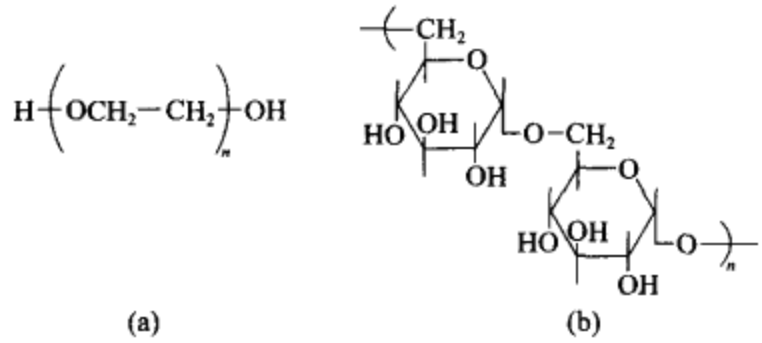


图 3.5

（a）PEG（聚合度 n 一般在 4～200 之间）；

（b）葡聚糖骨架片段的分子结构

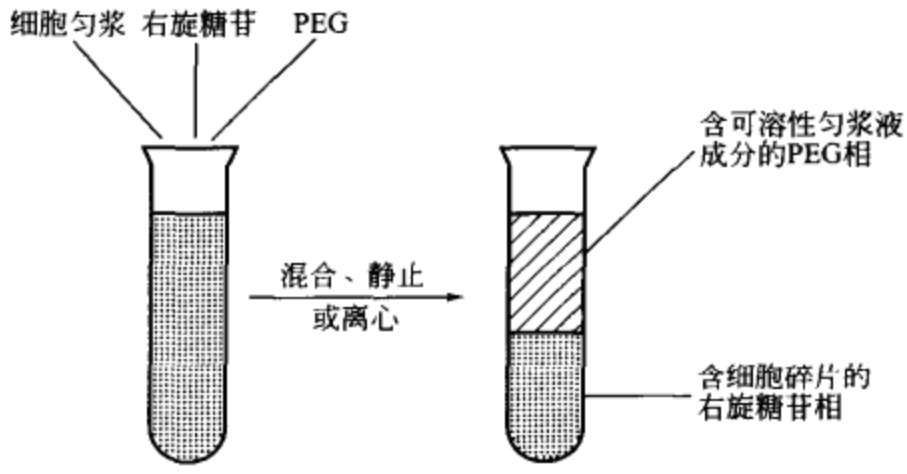


图 3.6　用于从蛋白质溶液中分离细胞碎片的双水相纯化系统的原理

当两个这样的不相容的水溶性部分混合时，随后的相分离进展缓慢。但是，离心力可以提高相分离的速度，因此混合之后可以进行离心以加速相分离。一旦两相分离完成，含有蛋白质的一相进入下一步程序。在实验室一般都是应用间歇式离心加速相分离。连续离心更适用于工业生产。含有目标蛋白的一相经过超滤（参见 3.4.3 超滤浓缩），蛋白质产物即刻得到浓缩。或者进行第二次双相提取也可以实现进一步的纯化，而这一次的分配系数不同于第一次。例如，改变所用聚合物的分子质量（不同的 PEG 的分子质量范围可以在 200～20000u 之间），或者调整溶液的离子强度都可以达到改变分配系数的目的。经过第二次双相分离，根据不同的实验条件一些蛋白质仍保留在 PEG 相中，而另一些则分配到下层相。两次双相分离后目标蛋白获得一定的纯化。

如果蛋白质分子连上一个与双相系统中极性最小的聚合物（一般是 PEG）特异结合的配基就可以使蛋白质更高程度地分配到该相中，这种技术称为亲和分配。亲和分配所采用的条件不仅使核酸和细胞碎片分配到极性更强的相中，还可以使多数蛋白质杂质也分配到极性强的相中，但目标蛋白由于配基的存在会分配到极性较弱的相中。亲和配基可以是特异的，如目标酶的底物或者是抑制剂，也可以是非特异的，如与多种蛋白质都有结合作用的许多染料。本章后面对亲和配基有更详细的讨论。

双水相分离技术是一种有潜在应用价值的澄清或部分纯化技术，理由如下：

① 方法温和，对多数蛋白质的生物活性只有很小的甚至没有负面影响；

② 所使用的许多聚合物对蛋白质有稳定作用；

③ 蛋白质的活性回收率一般都很高；

④ 扩大规模的技术难度小。

这项技术的主要缺点与对分离过程的分子机制缺乏了解有关，为达到有效分离而对技术进行改进只能完全依据经验，没有对其中关键原理的掌握，不可能对系统设计提出合理的方案。工业级的葡聚糖也相当昂贵，使用粗制剂或用其他聚合物如聚乙烯醇（polyvinyl alcohol，PVA）或聚乙烯树脂（polyvingl pyrrolidone，PVP）代替可以克服这一问题。由于存在上述缺点，并且有可以替代的成熟的分离技术如离心或过滤，使得这项技术的应用迄今为止受到限制。

3.3.4 核酸和脂类的去除

有时在开始纯化之前先去除或破坏细胞匀浆中的核酸是值得的也是必要的。大量核酸的释放常常会使细胞匀浆液的黏度大大增加，这通常都令匀浆液更难处理，尤其是在工业规模处理大量样品时。黏度的显著增加给去除细胞碎片的方法提出另外的要求，对这样的溶液可能要提高离心力并延长离心时间才能有效沉淀细胞碎片，如果去除碎片采用的是过滤的方法，那么黏度增加可能对流速和滤膜性能都有负面影响。如果处理的是原核生物细胞，匀浆过程中由于核酸释放引起的黏度增加尤其值得注意，因为原核细胞不同于真核细胞，核酸没有核膜包被，而核膜是在细胞内对核酸起保护作用的。

并非所有的纯化过程都需要特别的去除核酸的步骤，是否需要这样一步要视释放的核酸对悬液黏度的影响程度以及蛋白质终产物的预期用途而定，如果纯化蛋白质的目的是用于治疗，有效去除核酸尤其重要，当局的权威规定一般都强调每一个治疗剂量的终制剂中核酸含量至多不能超过几个皮克（参见第 4 章）。

在蛋白质纯化过程中通过沉淀或用核酸酶处理可以有效除去核酸，一些阳离子（荷正电）分子对沉淀 DNA 和 RNA 有效，它们与荷负电的核酸形成复合物并发生沉淀。最常用的沉淀剂是长链阳离子聚合物聚乙烯亚胺（图 3.7）。通过离心或过滤将沉淀与细胞碎片一起去除。纯化用于治疗的蛋白质时不建议使用聚乙烯亚胺，因为聚乙烯亚胺试剂中可能存在少量未反应的单体分子，这样的单体分子可能是致癌的。如果使用了可能含单体的聚乙烯亚胺，后面的纯化步骤必须确实能有效并完全去除可能保留在溶液中的任何聚合物或单体。

$$\leftarrow CH_2-CH_2-NH\rightarrow$$

图 3.7 聚乙烯亚胺重复结构单元的分子结构

用核酸酶处理也可以去除核酸，核酸酶催化核酸分子的酶降解。事实上核酸酶处理正在迅速成为蛋白质纯化过程中去除核酸的最普遍的方法。这种处理有效、廉价，而且不同于许多化学沉淀剂，核酸酶本身无害，也不影响蛋白质终产物的安全性。

一些类型的细胞或组织（动物源的尤其应注意）中脂的含量很可观，由于：①脂类是污染成分；②可能干扰后面的纯化步骤（如阻塞层析柱），因此有必要在进一步纯化之前从粗蛋白质溶液中去除脂层。溶液通过玻璃丝或网孔非常细的织物过滤能去除脂层。

3.4　浓缩和初步纯化

在许多蛋白质纯化过程的初始阶段，目标蛋白的浓度都很低，因而必须处理很大体积的液体，对微生物发酵过程中或动物细胞培养过程中分泌到培养液中的蛋白质尤其如此。因此有必要对这样的溶液进行浓缩，目的是使抽提的体积对后面的纯化步骤更易操作。实验室用于浓缩的方法主要有如下几种：

① 超滤；

② 沉淀（盐、溶剂等）；

③ 离子交换层析；

④ 真空透析；

⑤ 冷冻干燥；

⑥ 加入干燥的 Sephadex G-25（参见下面介绍）。

干燥的 Sephadex G-25 加入到稀的蛋白质溶液中，Sephadex 颗粒膨胀，在颗粒水合过程中水进入到颗粒结构内部，而蛋白质分子由于太大不能进入凝胶基质，保留在颗粒周围体积已减小的液体中，从而得到有效浓缩。不同于上面提到的许多其他技术，这种浓缩方法不宜放大，主要是由于经济因素。

对于大规模应用，抽提液的浓缩一般使用沉淀、离子交换层析或者超滤。每一种方法都有自身的缺点和优点，所有方法都能有效浓缩蛋白质溶液，同时可能达到一定程度的纯化。

3.4.1　沉淀浓缩

中性盐、有机溶剂、高分子量聚合物或通过适当的 pH 值调整都可以促进蛋白质的沉淀（表 3.4）。沉淀浓缩是已知的最古老的浓缩方法之一，中性盐硫酸铵溶解性高、价格低廉、对多数蛋白质都不引起变性、对许多蛋白质有稳定作用，因此可能是应用最普遍的蛋白质沉淀剂。

表 3.4　从溶液中沉淀蛋白质的不同方法和技术

方法和技术	示例或说明
加入中性盐	如硫酸铵
加入有机溶剂	如乙醇或丙酮
加入有机聚合物	如聚乙二醇
亲和沉淀	加入配基-常常是抗体-根据生物特异分子间作用从溶液中沉淀目标蛋白
调整溶液 pH	有些蛋白质在等电点时从溶液中析出
选择变性	如果在变性因素作用下，目标蛋白比杂蛋白更稳定，能沉淀杂蛋白而不沉淀目标蛋白的方法，如极端 pH 或提高温度

在蛋白质溶液中加入少量中性盐常常会使蛋白质溶解度增加，即“盐入效应”。但当盐浓度达到一定值时蛋白质的溶解度达到最高，此时再提高盐浓度会导致溶液中蛋白质

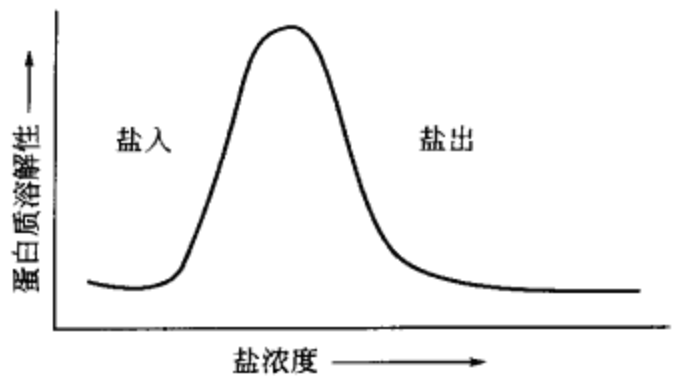


图 3.8　盐浓度对蛋白质溶解性的影响

初始盐浓度比较低，随着盐浓度的提高，蛋白质的溶解性常常会提高（盐入）。在达到最佳值后继续提高盐浓度，会导致蛋白质不稳定，最终出现沉淀（盐出）

稳定性下降，并最终发生沉淀，这是“盐出效应”（图 3.8）。高浓度的中性盐分子与蛋白质分子有力竞争水分子发生水合作用，促进蛋白质分子之间的作用，使得相邻蛋白质分子表面的疏水基团之间的作用成为主导作用，这种蛋白质与蛋白质之间的作用最终导致蛋白质沉淀。

在蛋白质溶液中加入各种有机溶剂也能促进蛋白质沉淀。加入的有机溶剂降低了水溶液的介电常数，从而促进溶液中荷电相反的基团之间的静电吸引，荷电相反的蛋白质之间的作用增强并最终形成沉淀。

经常用来促进蛋白质沉淀的有机溶剂有乙醇、异丙醇、丙酮和乙醚（图 3.9）。为防止蛋白质变性，使用有机溶剂沉淀蛋白质必须在 0℃或 0℃以下进行。由于这些有机溶剂能够降低水溶液的凝固点，因此溶液温度维持在零下几度通常是可行的。

加入有机聚合物如聚乙二醇也能促进蛋白质沉淀，但是加入这类聚合物通常会显著提高溶液的黏度，增加沉淀物回收的难度。一般通过离心或过滤回收沉淀，然后将沉淀溶解在小体积的重悬液中，达到有效浓缩。

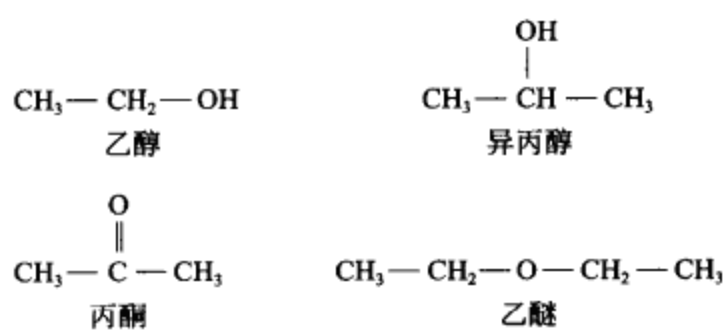


图 3.9　沉淀蛋白质最常用的有机溶剂的分子结构

沉淀浓缩在许多工业上的重要蛋白质的下游处理中也具有重要作用。这项技术相对容易操作，需要的设备也不多。很多情况下沉淀也可以对蛋白质起到一定的纯化作用（令不同的蛋白质从溶液中有效析出的盐浓度一般不同），通常生物活性的回收率也很高。这种技术也有一些缺点，尤其是用于工业生产：

① 许多沉淀剂都是高腐蚀性的，尤其是对离心机转头等不锈钢设备；

② 如果起始蛋白质浓度很低，使用沉淀方法一般是无效的，这种情况下蛋白质的回收率可能会很低；

③ 有些沉淀剂如丙酮和乙醚是高度易燃的，因此操作很危险，另外有些沉淀剂如乙醇相当昂贵；

④ 许多沉淀剂（如大多数有机溶剂）使用后必须适当处理，不可随意弃置；

⑤ 许多情况下在进一步操作之前必须去除沉淀中残留的任何沉淀剂。例如硫酸铵沉淀的蛋白质重新溶解进行离子交换层析之前必须去除其中的硫酸铵，去除方法是透析或过滤（后面讨论）。

纯化血清蛋白的传统方法包括数步蛋白质沉淀步骤，是一例重要的工业流程，使用的沉淀剂一般有乙醇和硫酸铵。但是许多新的流程在对蛋白质溶液进行初始浓缩时不再使用沉淀的方法。

3.4.2　离子交换浓缩

在任何一个给定的 pH 值，蛋白质所带的净电荷要么是正的，要么是负的，或者是零，

利用这个分子差别参数，选择合适的 pH 值、离子强度和离子交换介质可以分离不同的蛋白质分子，荷正电的蛋白质分子与阳离子交换介质结合，而荷负电的蛋白质分子与阴离子交换介质结合。随后用高离子强度的溶液（如含终浓度高达 0.5mol/L 的 NaCl 或 KCl 等盐的缓冲液）冲洗，可以很容易洗脱结合的蛋白质。离子交换是一种有效并相对便宜的初步浓缩方法，也可以使蛋白质得到一定程度的纯化。

在准备处理的溶液中直接加入离子交换介质可以很容易地将稀溶液中的蛋白质分批吸附。这种稀的蛋白质溶液有：已经去除完整细胞的含有胞外蛋白的发酵液和细胞培养液，或已经去除细胞碎片的细胞匀浆液。离子交换介质可以通过离心回收，然后放在过滤漏斗或不锈钢容器中，盛器有一个覆有筛网的出口，确保离子交换介质不流失。然后加入适当的高离子强度溶液从介质上洗脱结合的蛋白质，收集含蛋白质的洗脱液进行下一步操作。离子交换介质可以再生并重复用于蛋白质纯化。

如果靶蛋白带负电荷，可以使用带氨乙基或二乙氨乙基等功能基团的阴离子交换介质；如果目标蛋白带正电荷，使用带羟甲基等功能基团的阳离子交换介质（表 3.5）。功能基团与多孔渗水珠子共价连接，这些珠子多由交联葡聚糖（如 Sephadex 交换介质）、琼脂糖（如 Sepharose 交换介质）或纤维素（如 Sephacel 交换介质）等制备。

表 3.5　附在层析珠粒上形成阳离子或阴离子交换介质的功能基团

基团名称	基团结构	交换介质类型
二乙氨乙基(DEAE)	$-O-(CH_2)_2-\overset{H}{\underset{\diagup}{\diagdown}}N^+-(CH_2-CH_3)_2$	阴离子交换介质
季铵(Q)	$-CH_2-N^+-(CH_3)_3$	阴离子交换介质
季铵乙基(QAE)	$-O-(CH_2)_2-\overset{(C_2H_5)_2}{\underset{\diagup}{\diagdown}}N^+-CH_2-\overset{OH}{\underset{\diagup}{\diagdown}}CH-CH_3$	阴离子交换介质
羧甲基(CM)	$-O-CH_2-COO^-$	阳离子交换介质
甲磺酰(S)	$-CH_2-SO_3^-$	阳离子交换介质
丙磺酰(SP)	$-CH_2-CH_2-CH_2-SO_3^-$	阳离子交换介质

离子交换技术比较普及是因为多数介质相对便宜而且耐用，并容易再生，一般情况下蛋白质回收率都非常高，分批吸附-洗脱也使蛋白质溶液得到高度净化，许多对溶液有不利影响的杂质要么不吸附离子交换介质，要么在洗脱目标蛋白的条件下不被洗脱。除了部分变性或聚集的蛋白质外，不需要的杂质还包括前面净化步骤未去除的微粒、各种脂类和/或糖类。为了防止在后面的纯化步骤中堵塞柱子，需要对含杂质的蛋白质溶液进行有效净化。初步的离子交换处理也使蛋白质得到一定程度的纯化，因为只有带电性质相似的分子才会与目标分子同时结合并被共洗脱。

3.4.3　超滤浓缩

超滤可以迅速方便地浓缩蛋白质溶液（图 3.10），而且这种方法在实验室和工业上都是应用最普遍的。正如前面所讨论的，微过滤技术用于从溶液中去除细胞和细胞碎片很有效，微过滤中使用的膜滤器的孔径的范围一般是 0.1～10μm，这样的孔径可以截留完整细胞和大的微粒物质，但不能截留绝大多数像蛋白质这样的大分子化合物，而超滤膜的孔径一般是 1～20nm，这么小的孔径足以截留小分子量的蛋白质。现在出售的超滤膜的截留分子质量为 1～300ku，应用最普遍的是截留分子质量为 3ku、10ku、30ku、50ku 和 100ku 的膜。

传统的超滤膜是醋酸纤维素膜或硝酸纤维素膜，现在生产的膜也使用其他一些材料如聚

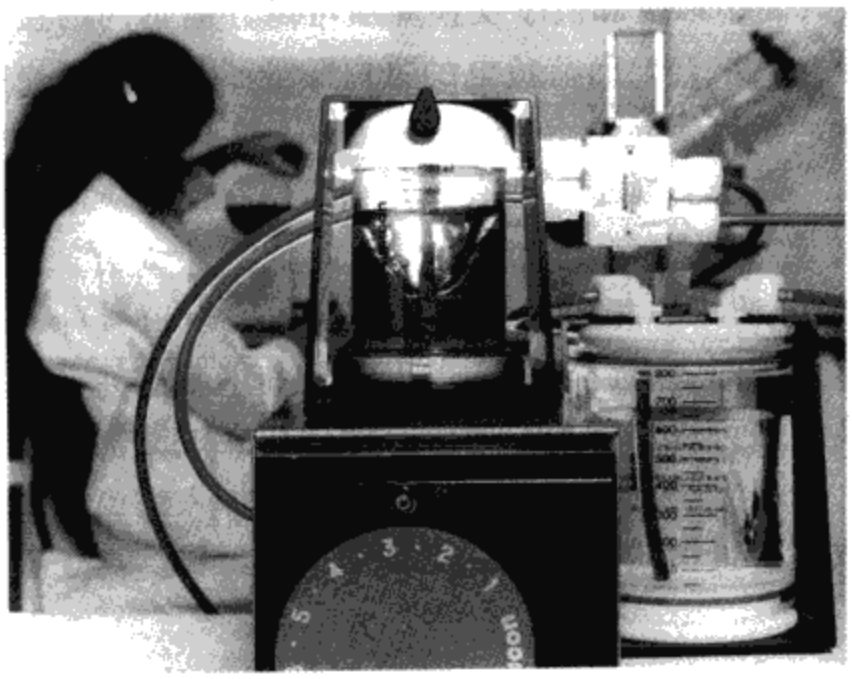


图 3.10　实验室规模分离分子的超滤器

（照片承蒙 Amicon 公司允许使用）

氯乙烯和聚碳酸酯。这种塑料膜与纤维素膜相比具有更高的化学和物理稳定性。生产超滤膜必须具备一个重要的先决条件，那就是所使用材料的蛋白质吸附性低。有一点必须强调，无论使用哪种材料，所获得的孔径都不可能是均一的，一般都会围绕平均孔径有一个较大的偏差范围。因此最好将任何一个滤器的标示截留分子量视作参考数据。处理蛋白质时建议使用标示截留分子量是 5ku 的膜或截留分子量比目标蛋白分子量低得多的膜。还有一点也很重要，那就是标示的截留分子量是对球蛋白而言，目标蛋白的轮廓对超滤有影响，如果蛋白质有点儿拉长，截留分子量小得多的滤膜可能也起不到截留作用，过多的翻译后修饰尤其是糖基化对超滤行为可能也有影响。

实验室的超滤一般都是在一个搅拌系统中进行，膜放在超滤池底部的支撑筛网上，准备浓缩的样品装在池内。通常用氮气加压，以确保样品充分流过滤器，分子量低于滤器截留分子量的分子（如水、盐和低分子量化合物）全部通过滤器，因此分子量大大高于标示的截留分子量的分子得到浓缩。通过靠近膜表面的搅拌机械的搅拌作用最大程度地减小浓缩的极化现象（膜表面形成浓缩分子层不能通过滤膜）。如果不加以阻止，浓缩极化现象将导致流速下降。实验室使用的其他超滤方式还有筒式系统，超滤膜在筒内高度折叠，系统所要求的维持适当流速的压力通常由蠕动泵提供。

大规模超滤系统总是使用筒式滤器（图 3.11），因为筒式滤器在有限的面积内容纳的过滤面积大。流入液以正确角度尤其是切线角度流过膜表面可以避免浓缩极化现象。超滤膜可以打褶，然后将两末端连接，形成一个圆柱筒。或者膜也可以放在支撑网上，然后环绕中央收集管呈螺旋形卷起，滤出液流到收集管中。另一种应用比较广泛的膜构造是中空纤维，中空圆柱筒的外壳装填成束的中空纤维，中空纤维的外观有点儿像饮料吸管，但它们的内径相当小，准备过滤的液体在泵的作用下从中空纤维中央流过，比滤膜标示的截流分子量低的分子穿过中空纤维的壁，沿整个中空纤维管渗出的液体通过阀门流出，中空纤维另一侧的浓缩液通过流出管收集并保留。

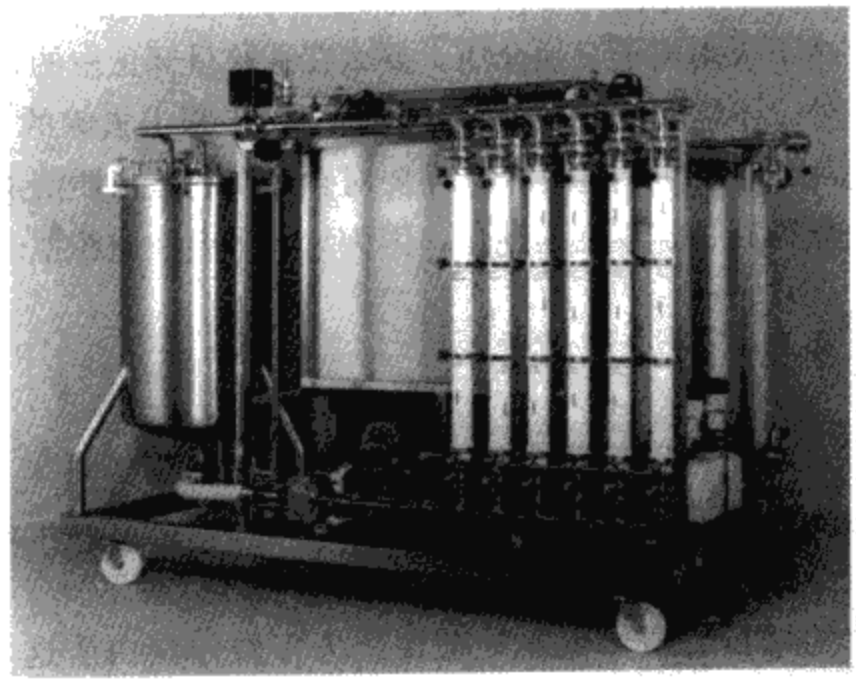


图 3.11　工业规模超滤系统示例

该系统（SPM180）由 16.7m² 螺旋膜组成。可以用于超滤或渗滤（照片承蒙 Amicon Ltd. 允许使用）

之后渗出液一般都丢弃，而含目标蛋白的保留液进行下一步处理，如果需

要进一步浓缩，保留液可以在过滤系统中再循环。

超滤成为蛋白质浓缩的主要方法，原因有以下几点：

① 方法温和，对蛋白质生物活性的破坏小；

② 回收率高，一些生产商声称回收率可以达到99%以上；

③ 与其他浓缩方法相比，操作时间短；

④ 需要的辅助设备少；

⑤ 经过超滤的蛋白质也可以得到一定程度的纯化（依据分子量不同分离）。

这种超滤技术的缺点是膜容易很快堵塞，黏的溶液也导致流速迅速下降，使操作时间延长。

超滤还可以用于其他目的。正如上面提到的，超滤也可以实现一定程度的纯化，还可以用于从溶液中去除热原，关于这一点第4章将进一步讨论。这项技术还广泛用于从渗滤后的蛋白质溶液中去除低分子量的分子。

3.4.4　渗滤

应用超滤系统减少或完全除去溶液中的小分子量分子的方法就是渗滤。实际上从蛋白质溶液中去除的一般包括盐、乙醇等溶剂、缓冲液成分、氨基酸、肽、添加的蛋白质稳定剂或其他分子。渗滤之前一般是超滤步骤，目的是初步降低溶液体积。除了保留池的体积维持不变之外，实际的渗滤过程和超滤是一样的。不断添加不含准备去除的低分子量分子的溶剂可以达到这一目的。通过浓缩液再循环，以及向系统中加入足量的新的溶剂，使渗出液的体积达到5倍初始体积，能从溶液中去除99%以上的能自由透过膜的分子。透析或凝胶过滤层析也可以从蛋白质溶液中去除低分子量杂质，但由于快速、有效，而且使用的设备与超滤相同，渗滤正成为首选方法。

3.5　柱　层　析

任何纯化过程的初始步骤均可以设计成为：①分离和浓缩目标蛋白；②去除大部分杂质，这些杂质包括颗粒物、脂质或可能污染或堵塞层析柱的其他物质。对于初始纯化步骤所采用的技术手段，不着重于目标蛋白的纯化程度，而在于必须对目标蛋白有很高的回收率。进一步的蛋白质纯化通常应用柱层析技术来实现。

应用柱层析技术纯化蛋白质时，关注于将不同的蛋白质通过固液两相间的分配差异进行相互分离：固定相（色谱颗粒，通常填充在圆柱中）、流动相（通常是缓冲液）。除凝胶过滤层析外，所有应用于蛋白质纯化的柱层析都具有吸附性质。在通常情况下分离蛋白质混合物时，进样后柱层析条件能够选择性保留目标蛋白质。在理想状态下，此目标蛋白质成为唯一保留在层析柱上的组分，但事实上很难实现。进样完成后，层析柱用流动相冲洗（灌洗）以除去不被层析柱保留的组分。改变流动相的组成，将层析柱吸附的组分洗脱下来，洗脱液收集于试管中，用于进一步的总蛋白测定和目标蛋白检测（图3.12）。收集含有目标蛋白的部分用于下一步的纯化。

每一个蛋白质具有一系列区别于其他蛋白质分子的特定属性，这些属性包括粒径、形

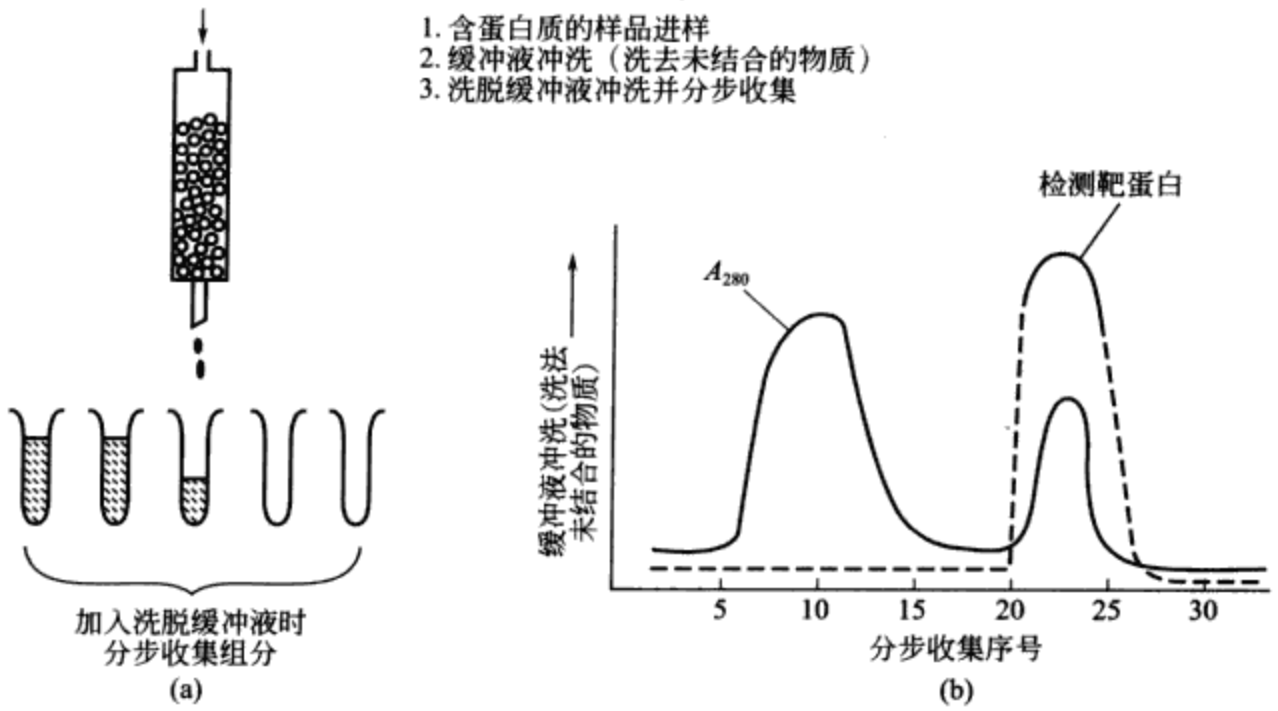


图 3.12

(a) 典型的蛋白质层析（吸附）纯化程序；注意层析介质颗粒不是按比例画的，事实上它们的直径＜0.1mm。(b) 分析解吸附蛋白质的分步收集液：ⅰ. 测 280nm 下吸光度得出总蛋白含量；ⅱ. 检测靶蛋白活性。图示中有两个明显的蛋白质主峰，其中一个含有靶蛋白。经过这样的吸附和解吸附步骤，蛋白质得到纯化

状、总电荷、表面疏水基团百分率、与特定配基结合的能力等。单就任何一项属性作比较，有相当多的蛋白质分子与其他蛋白质分子在性质上相近。但是，所有蛋白质都具备独特的上述属性的特定组合，构成了这个蛋白质的层析“指纹”。许多层析技术根据蛋白质这些属性上的差异将不同的蛋白质得到分离（表 3.6）。采用任何一个利用蛋白质分子性质差异的层析技术将大大提高目标蛋白的纯度，组合使用这些层析技术可以制备高纯度的蛋白质。

表 3.6 纯化蛋白质常用的层析技术及其应用原理

层析技术	应用原理
离子交换层析	在特定 pH 条件下蛋白质的表面电荷的差异
凝胶过滤层析	蛋白质分子量或分子形状的差异
亲和层析	基于蛋白质和特定配基间的特异的生物作用
疏水作用层析	蛋白质表面疏水性的差异
聚焦层析	蛋白质等电点的差异
羟基磷灰石层析	蛋白质和磷酸钙介质之间复杂的相互作用(不完全了解)

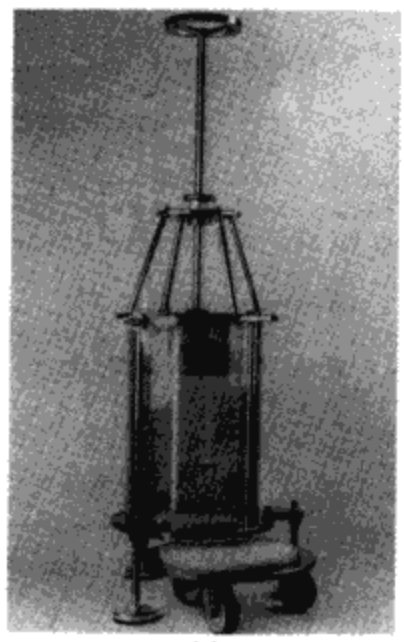
应用层析技术可以将许多蛋白质有效地分离开来，然而对于感兴趣的蛋白质而言，其回收率可能大大低于 100%，通常情况下，回收率在 25%～95%之间。在保证理想的蛋白质纯度的前提下，设计的纯化方案应采用尽可能少的层析分离步骤。每一步层析分离技术的具体条件对于目标蛋白的回收率有着至关重要的影响，因而常常需要优化。蛋白质纯化体系常采用 3～5 个高分离能力的层析分离步骤，蛋白质纯化常用的层析技术将在下列各节中予以讨论。

3.5.1 空间排阻层析（凝胶过滤层析）

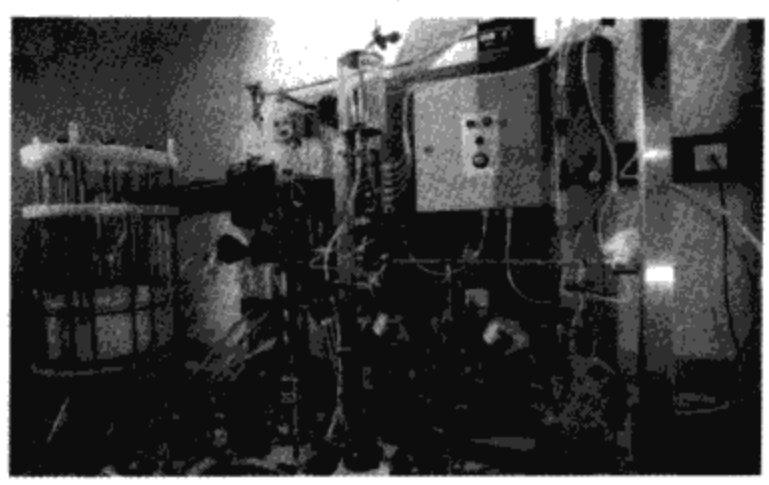
空间排阻层析，又称凝胶渗透层析、凝胶过滤层析，工作原理是应用蛋白质分子量或分

子形状的差异进行分离。由于通过此项技术进行分离的蛋白质分子具有相似的分子形状，简单而言，凝胶过滤层析可以描述为通过分子量的差异将蛋白质分离开来。

应用空间排阻层析时，将含有蛋白质的溶液通过装有多孔性介质填料的层析柱床，收集流出的蛋白质组分（图3.13）。当样品从层析柱的顶端向下运动时，大的蛋白质分子不能进入凝胶颗粒而迅速洗脱。由于小的蛋白质分子能够进入凝胶颗粒，其在凝胶柱中的迁移被延缓。可以将基质颗粒的内部结构想像成一个迷宫，小的足以进入凝胶的蛋白质必须从其中穿过。穿过迷宫的各种可能的路线的行进距离是不同的，因此所有能进入凝胶的蛋白质在凝胶基质中的保留时间也不同。蛋白质分子越小，它可能进入的路线就越多，因而它在颗粒结构中的保留时间就越长。因此蛋白质分子从凝胶过滤柱洗脱的先后顺序一般是按分子量由高到低。



(a)



(b)

图3.13　层析柱

(a) 图中的玻璃柱由Merck公司生产。该公司以及其他一些生产商（如Bio-Rad和Pharmacia Biotech）生产各种柱子（规格从1ml到数升，材质有玻璃、塑料或不锈钢）。(b) 生产规模层析系统。图示的系统是建在英国的一个生物技术公司生产临床试验用（蛋白质）药物的系统。实物柱子位于图的左侧

所用的大多数凝胶基质都是化学交联的聚合物分子如葡聚糖、琼脂糖、丙烯酰胺和乙烯聚合物制备的，交联程度控制凝胶颗粒的平均孔径。因此用任何一种聚合物合成的凝胶都可以有不同的孔径，交联程度越高，平均孔径越小，凝胶颗粒的刚性越强。高度交联的凝胶基质如Sephadex G-25或Bio Gel P2，可以用来分离蛋白质和其他分子量更小的分子，也经常用于从蛋白质溶液中除去低分子量的缓冲液成分和盐（图3.14）。

较大孔径的凝胶用于蛋白质分子之间的分离。在任何给定条件下使用什么孔径的凝胶最合适很大程度上决定于：①目标蛋白的分子量；②主要蛋白质杂质的分子量。所有生产凝胶过滤介质的公司都会公布每一种凝胶的最有效分离范围（表3.7）。多数凝胶过滤介质都有按孔径分的不同的等级，典型的有粗级、中级、细级和超细级。尽管颗粒越小（细/超细）产生的分辨率越高，但流速也越低。

Sephadex凝胶是开发最早的分离胶之一。这类凝胶是由表氯醇交联葡聚糖制备，葡聚糖是由葡萄糖单体主要通过α1→6糖苷键连接组成的多聚糖。有些Sephadex凝胶如Sephadex G-25或Sephadex G-50刚性很强，是由于交联度高。葡聚糖制备的大孔径凝胶（Sephadex G-100或Sephadex G-200）刚性不强，容易压缩。正是由于这一原因，后者只适合于小规模应用（尤其是实验室）。

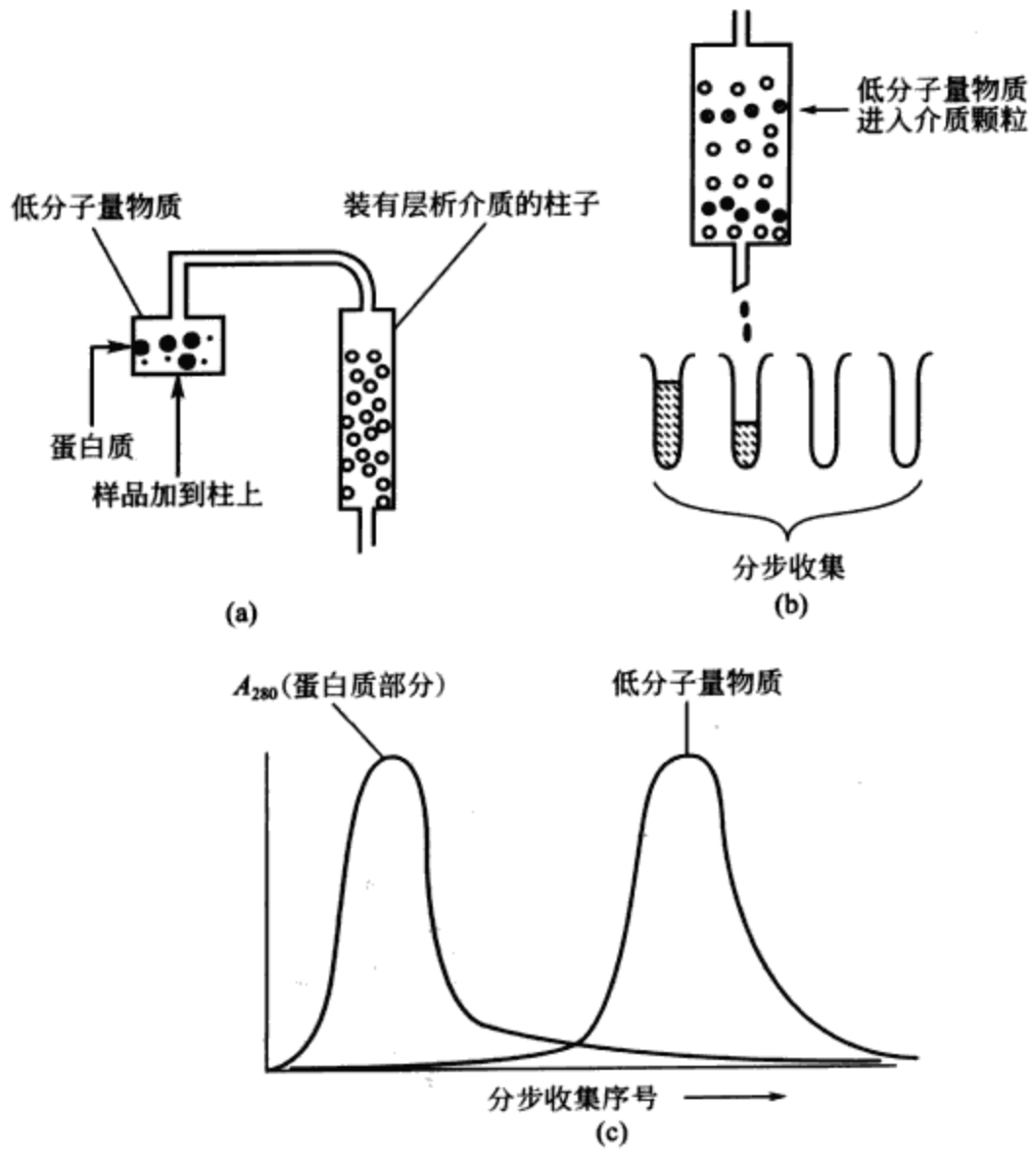


图 3.14　应用凝胶过滤层析分离蛋白质分子和分子量低得多的分子❶

(a) 和 (b) 流动相（流动缓冲液）中不含从蛋白质中分离的分子。使用高度交联的多孔颗粒，蛋白质分子不能进入孔内部。但低分子量物质能进入颗粒内部，因此沿层析柱流下的进程被延误；(c) 先收集的部分含有蛋白质分子，而后收集的部分含有低分子量物质。实际上应用凝胶过滤层析进行分组分离主要用于分离蛋白质和盐（如硫酸铵沉淀之后），或者是用于交换缓冲体系

表 3.7　商业化凝胶过滤介质的孔径和分离范围

凝胶类型	分离范围/ku(以球蛋白计)	孔径/μm
Sephadex G-10	0～0.7	40～120
Sephadex G-25	1～5	50～150
Sephadex G-100	4～150	40～120
Sephadex G-200	5～600	40～120
Sephacryl S-100	1～100	25～75
Sephacryl S-300	10～1500	25～75
Sepharose 6-B	10～4000	45～165
Sepharose 2-B	70～40000	60～200
Bio-Gel P-2	0.1～1.8	45～90
Bio-Gel P-6	1～6	90～180
Bio-Gel P-30	2.5～40	90～180
Bio-Gel P100	5～100	90～180
Bio-Gel A 0.5m	10～500	75～150
Bio-Gel A 5m	10～5000	75～150
Bio-Gel A 15m	40～15000	75～150

❶ 事实上层析介质颗粒紧紧装填在柱子内。图中颗粒彼此分开只是为了看起来清晰。而且图不是按比例画的；蛋白质分子远小于单个介质颗粒。

Sephacryl 这种凝胶过滤介质与 Sephadex 相比，具有更强的刚性和物理稳定性，因此更适于在工业上应用。Sephacryl 凝胶是由通过 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺交联的烯丙基葡聚糖制备的，Sepharose 凝胶由多聚琼脂糖制备。这些凝胶尤其适合高分子量蛋白质的分离，它们在工业上的应用很有限，主要是物理稳定性差。这种凝胶有非常开放的孔状结构，这一结构不是通过共价键连接来稳定的，而是通过在邻近的琼脂糖分子之间形成氢键。温度高于40℃时 Sepharose 凝胶结构崩解，因此，不同于 Sephadex 或 Sephacryl 凝胶，Sepharose 凝胶不能高压灭菌。在凝胶结构中共价交联琼脂糖部分可以提高 Sepharose 凝胶的化学和物理稳定性。在碱性条件下共温育 Sepharose 和交联剂 2,3-二溴代丙醇可以实现这样的交联。

Bio Gel P 类介质是通过 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺交联丙烯酰胺制备的。Bio Gel P 通常制成珠状，在分离含能降解由生物活性物质如葡聚糖制备的凝胶的酶的样品时非常有用。Bio Gel A 珠粒由琼脂糖制成，孔径通过琼脂糖的比例控制。

Merck 公司生产的 Fractogel 是较近期才开发的凝胶介质。这种凝胶是寡聚亚乙基二醇、甲基丙烯酸缩水甘油酯和五赤醇-二甲基丙烯酸酯的共聚物。Fractogel 的内孔壁由缠绕的多聚体凝聚形成，使得凝胶的机械强度更高，这样的机械强度能满足大规模制备的要求。

通过空间排阻层析分离蛋白质要求使用长的层析柱。一般情况下，柱长是柱直径的25～40倍以上，这样的比例是使蛋白质混合物得到充分的分离所必需的，混合物在沿层析柱向下迁移的过程中按分子大小和形状分离成不连续的蛋白质带。

工业上使用的凝胶过滤柱可长达数米。制备用凝胶必须有很强的机械刚性，以免被压缩降低流速。设计工业规模层析柱的一个替代方案是使用堆叠凝胶系统，即将凝胶介质包装成一些同样短粗的柱子，然后将一些这样堆叠的柱子竖向串联（参见第7章胰岛素的工业生产的相关内容）。每个柱子之间的连接距离保持最短，整个层叠系统就像一个具有相似尺寸的层析柱，但系统中的层析凝胶经受的分压比较低，而且，如果某一根柱子堵塞（通常是第一根），可以很容易地从系统上取下并更换一根新的柱子。

在蛋白质纯化的初期阶段很少使用空间排阻层析。为了获得有效分离，空间排阻层析的上样体积必须很小，一般是柱体积的2%～5%，而且由于样品纯度不够，很容易堵塞柱子。因此空间排阻层析经常用在纯化过程的最后，此时目标蛋白已经相对比较纯，而且样品的体积已经浓缩到很小，上样后用合适的缓冲液冲洗将蛋白质成分从柱上顺序洗脱。很多情况下柱上流出的洗脱液要经过一个检测器，当含蛋白质的带从柱上洗脱时可以立刻检测到。洗脱液一般分步收集，如果是制备规模，收集的每一部分可能有数升。虽然空间排阻层析是一项有效的分离技术，但是相对于上样体积而言，洗脱液一般都高度稀释。和其他层析介质相比，柱流速也常常低得多，这导致过程时间长，如果在工业上应用，可能会使成本增加。

3.5.2　离子交换层析

在组成蛋白质的20种氨基酸中有几种的侧链是带电荷的。在 pH7.0 时天冬氨酸和谷氨酸的酸性侧链基团带负电荷，而赖氨酸、精氨酸和组氨酸的碱性侧链基团带正电荷（图3.15）。因此蛋白质分子中既有正电荷也有负电荷，主要是由于分子中存在不同数量的这7种氨基酸残基（N末端的氨基和C末端的羧基对整个蛋白质分子的带电性质也有影响）。任何蛋白质带的净电荷都取决于蛋白质中这些氨基酸残基的相对数量，以及蛋白质溶液的 pH 值。蛋白质分子所带净电荷为零时的 pH 值称作等电点（pI），

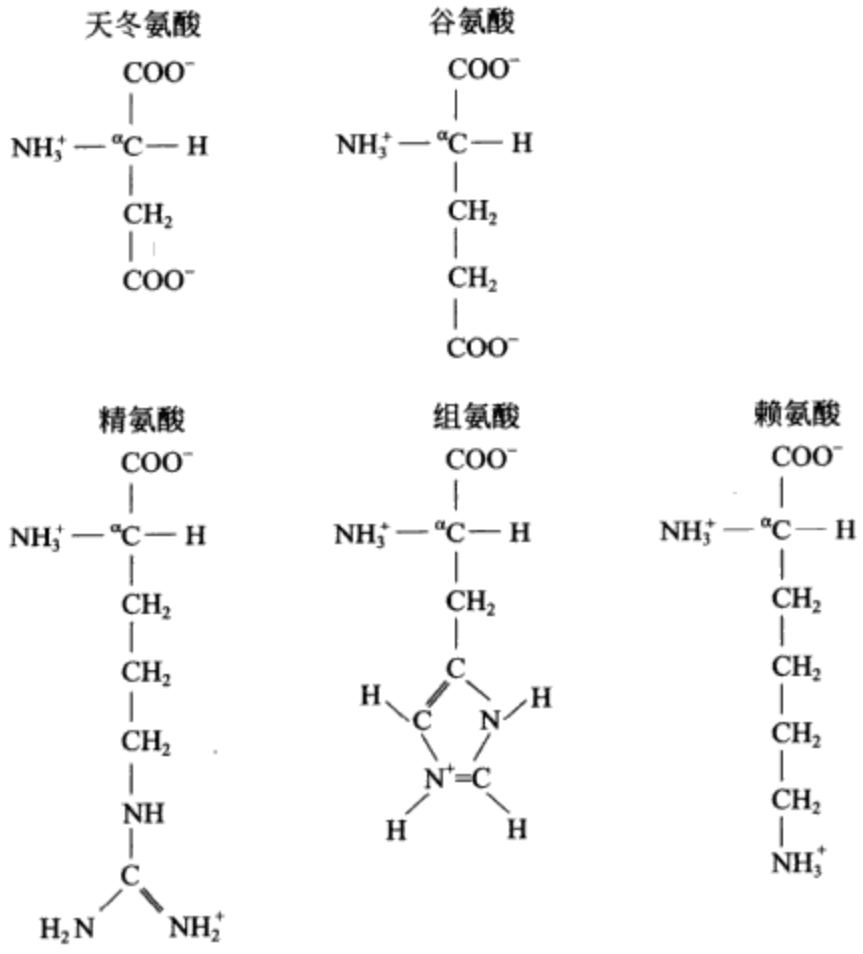


图 3.15　在 pH7.0 时带净电荷的氨基酸的结构

蛋白质分子的净电荷与分子中除末端氨基和羧基之外的全部氨基和羧基有关，因为末端这些基团直接参与形成肽键

pH 值高于等电点时蛋白质分子带负的净电荷，而 pH 值低于等电点时蛋白质分子带正的净电荷。

离子交换层析的基础是带电分子与固相基质的可逆的静电作用，固相基质上共价连接了与带电分子带相反电荷的侧链基团（图 3.16）。改变 pH 值或增加洗脱缓冲液的盐浓度可以洗脱蛋白质。共价连接了阳性基团的离子交换介质称为阴离子交换介质，吸附阴离子蛋白质，即带负的静电的蛋白质。共价连接了带负电荷基团的离子交换介质称为阳离子交换介质，吸附阳离子蛋白质，即带正的静电的蛋白质。带正电荷的功能基团（阴离子交换剂）有很多，如氨乙基和二乙氨乙基。连接适当的基质形成阳离子交换剂的带负电基团有磺基和羧甲基（参见表 3.6）。也可以用“强”或“弱”来描述离子交换剂。强离子交换树脂在宽 pH 值范围内保持离子化，而弱离子交换树脂只在窄 pH 值范围内离子化。

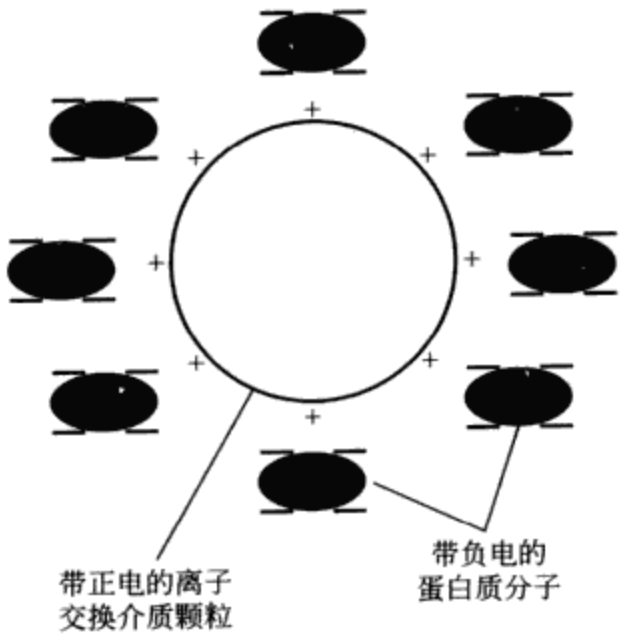


图 3.16　离子交换层析的原理

图示的是阴离子交换层析。层析介质带正电荷。蛋白质分子在层析 pH 下带负的净电荷，与介质发生静电作用而结合

在阳离子交换过程中，带正电荷的蛋白质与带负电荷的离子交换介质结合，取代原先通过静电作用结合在树脂上的相应离子（经常是 H^+）。用含盐缓冲液冲洗可以洗脱蛋白质，盐阳离子，常常是 NaCl 中的 Na^+，从离子交换树脂上顺次取代蛋白质。对于带负电荷的蛋白质，显然是用阴离子交换剂，蛋白质取代

带负电荷的相应离子吸附到柱子上。

绝大多数纯化过程都至少要用到一步离子交换，离子交换是蛋白质纯化中唯一的最普遍的层析技术。离子交换层析普及的基础是高水平的分辨率，可以直接放大规模（应用于工业），以及使用方便，柱再生容易，另外还使目标蛋白得到浓缩，它也是目前的层析技术中费用最低的。大多数蛋白质在生理 pH 值的净电荷是负值，因此阴离子交换层析应用最普遍。

生产离子交换介质用的支持基质很多。理想的基质应该是惰性的，具有刚性结构，渗透性强。刚性要求是为了方便放大规模并能在高流速下操作，因为软性基质常常被压紧，甚至在装填工业用柱子时由于装填量大在自身重力下也会被压紧。理想的凝胶孔径应该足够大，蛋白质可以自由进入基质内部腔，因为这样可以大大提高结合能力（即蛋白质可以保留在珠子内部的腔中，而不只在珠子表面）。

纤维素离子交换剂是蛋白质纯化系统中最早得到广泛应用的。纤维素离子交换剂既有阳离子交换剂，也有阴离子交换剂。由于易压缩，虽然可以通过分批吸附浓缩蛋白质，纤维素离子交换剂在工业规模层析中应用不广泛。目前已经开发出改良的纤维素离子交换剂如二乙氨乙基（diethylaminoethyl，DEAE）Sephacel（Pharmacia），尽管这些交换剂还是有些局限于实验室规模的应用。Sephadex 离子交换剂是通过将带电基团共价连接于 Sephadex G-25 或 Sephadex G-50（参考前面部分）制备的，G-50 型相对易压缩，G-25 型交换剂尽管很坚固，但由于颗粒孔径太小，蛋白质分子不能渗透，所以结合能力低。

还有一些其他的离子交换树脂是以琼脂糖等聚合物为基质的（如 Bio-Rad 的 Bio Gel A 离子交换剂和 Pharmacia 的 Sepharose 离子交换剂）。这类离子交换介质一般既适于实验室规模也适用于大规模应用，因为它们同时兼具高容量和刚性，在高流速下不被压缩。这类交换剂的高容量反映出它们具有孔径大的特点，蛋白质分子可以自由接近凝胶珠内部的结合位点。

Fractogel（Merck）是另一种既适用于实验室又适合大规模分离的离子交换材料。它的适宜性来自于它的机械和化学稳定性。在珠子的外部和内部通过共价连接引入带电基团，对基本的凝胶结构进行化学修饰，使其更适宜用作离子交换介质。由于孔径相当大，多数蛋白质可以自由进入凝胶基质，因此凝胶具有高的蛋白结合能力。

Merck 公司还开发了一种离子交换树脂，称作“触角型”介质，既适用于分析也适用于制备。传统的离子交换剂由直接连接于离子交换基质的带电（离子化的）基团组成，显然吸附蛋白质的结合位点排列非常刚性，这自然暗示着结合可能使结合的蛋白质的构象结构变形。不清楚变形到什么程度会导致蛋白质变性和失活。但是必须说明的是，使用传统交换剂时记录的生物活性蛋白质的回收率很高，这表明这种效应对多数蛋白质都是最小的。触角型交换剂由珠状支持基质组成，线性带电聚合物（触角）连接到支持基质上［图 3.17（a）］。这种触角结构是柔韧的，可以自动采取一种与吸附蛋白质结合接触程度最大的构象。这种柔性使任何诱发的结合蛋白的变形达到最小甚至消除。这种离子交换剂的结合能力可以通过改变触角长度控制。合适的支持材料表面必须带有一级或二级羟基。迄今为止所用的基质都是硅胶或有机聚合物类的。触角聚合物通常由重复的引入了适当的带电基团的丙烯酰胺基团构成，合适的基团包括阴离子交换剂中的 DEAE 基团或者是阳离子交换剂中的磺基。这些基团通过接枝聚合过程共价连接于支持基质。在接枝聚合过程中，支持基质与取代化的丙烯酰胺单体和 Cs（Ⅳ）离子共温育［图 3.17（b）］。铯离子与基质表面的羟基结合促进基团形

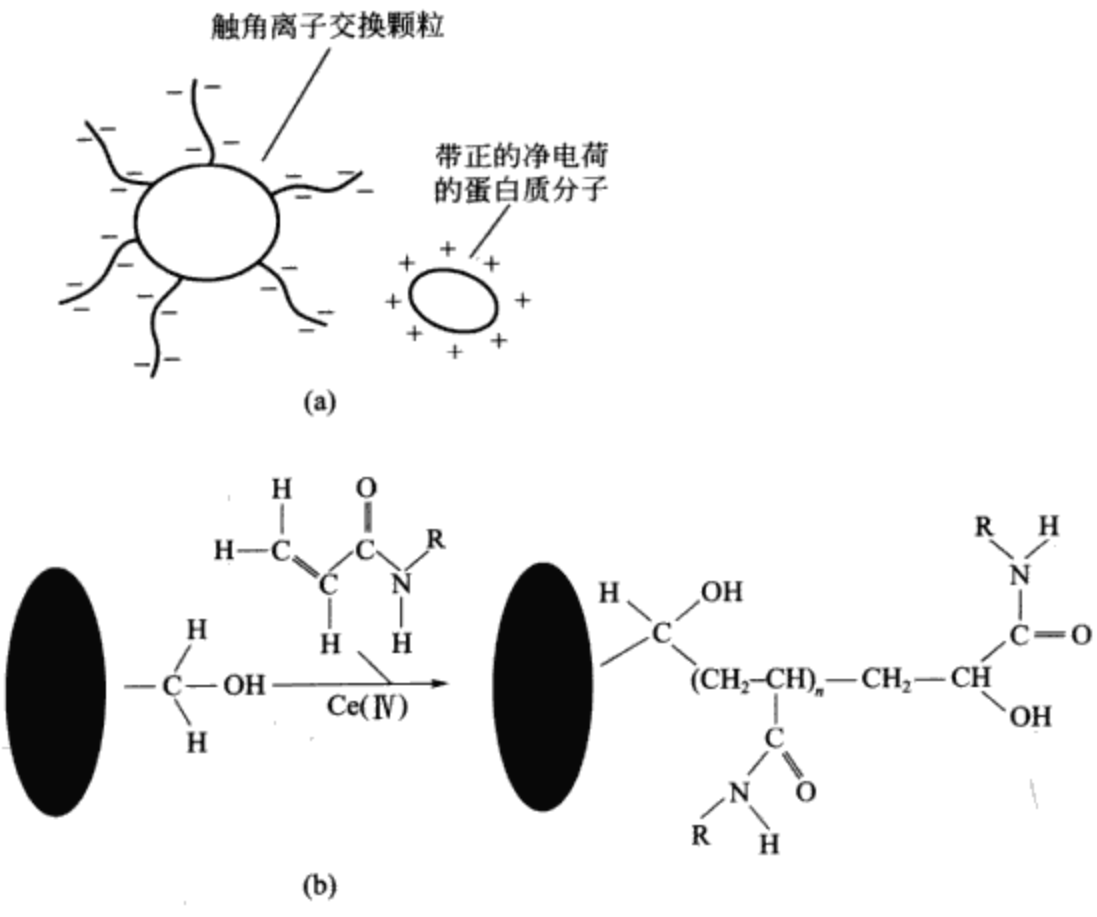


图 3.17 Merck 公司生产的触角型离子交换剂

(a) 蛋白质分子和带正电荷的触角型离子交换剂之间的相互作用；

(b) 在亲水支持介质上嫁接聚合丙烯酰胺衍生物的化学修饰原理

成，启动化学链反应，取代的丙烯酰胺基团共价连接到支持基质上，随后生成聚丙烯酰胺链。一条线性聚丙烯酰胺链通常由 15～25 个丙烯酰胺单体组成，间隔带有带电基团。

3.5.3 疏水作用层析

在组成蛋白质的常见的 20 种氨基酸中，有 8 种氨基酸的侧链是非极性的，属疏水性氨基酸（R 基，图 3.18）。多数蛋白质分子都是折叠的，这样可以使其中大多数疏水性氨基酸残基包埋在分子内部，因而与周围的水性环境隔离（第 1 章）。包埋在内部的疏水性基团通常与临近的疏水基团发生作用。但是也有少数疏水性氨基酸残基位于蛋白质分子表面，暴露于外部水性环境中。不同的蛋白质分子表面的疏水性氨基酸残基的数量和类型都不同，因而表面疏水程度也不同。蛋白质分子表面的疏水性氨基酸残基倾向于成簇或成团排列。疏水作用层析根据蛋白质分子表面疏水性的不同分离蛋白质，需要蛋白质表面疏水团和共价连接到适当基质的疏水基团之间发生疏水作用。

最普及的疏水作用层析树脂是共价连接了疏水基团的交联琼脂糖凝胶，有代表性的有 Pharmacia 的辛基-Sepharose 和苯基-Sepharose 凝胶，分别带有辛基和苯基疏水基团（图 3.19）。在适当的基质上连接辛基形成的层析珠粒疏水性非常强。高度疏水的蛋白质的层析应该避免使用辛基-Sepharose，因为蛋白质与凝胶基质的结合太牢固，若洗脱蛋白质必然会使蛋白质变性。Bio-Rad 和 Merck 等公司也出售各种疏水作用层析树脂。

通过疏水作用层析分离蛋白质取决于蛋白质分子本身、凝胶基质和周围溶剂——通常是水性的之间的作用。加入中性盐（如硫酸铵或氯化钠）提高溶液的离子强度，可以提高蛋白质分子的疏水性。这或多或少可以简单地解释为溶液中盐离子的水合作用导致每个离子周围

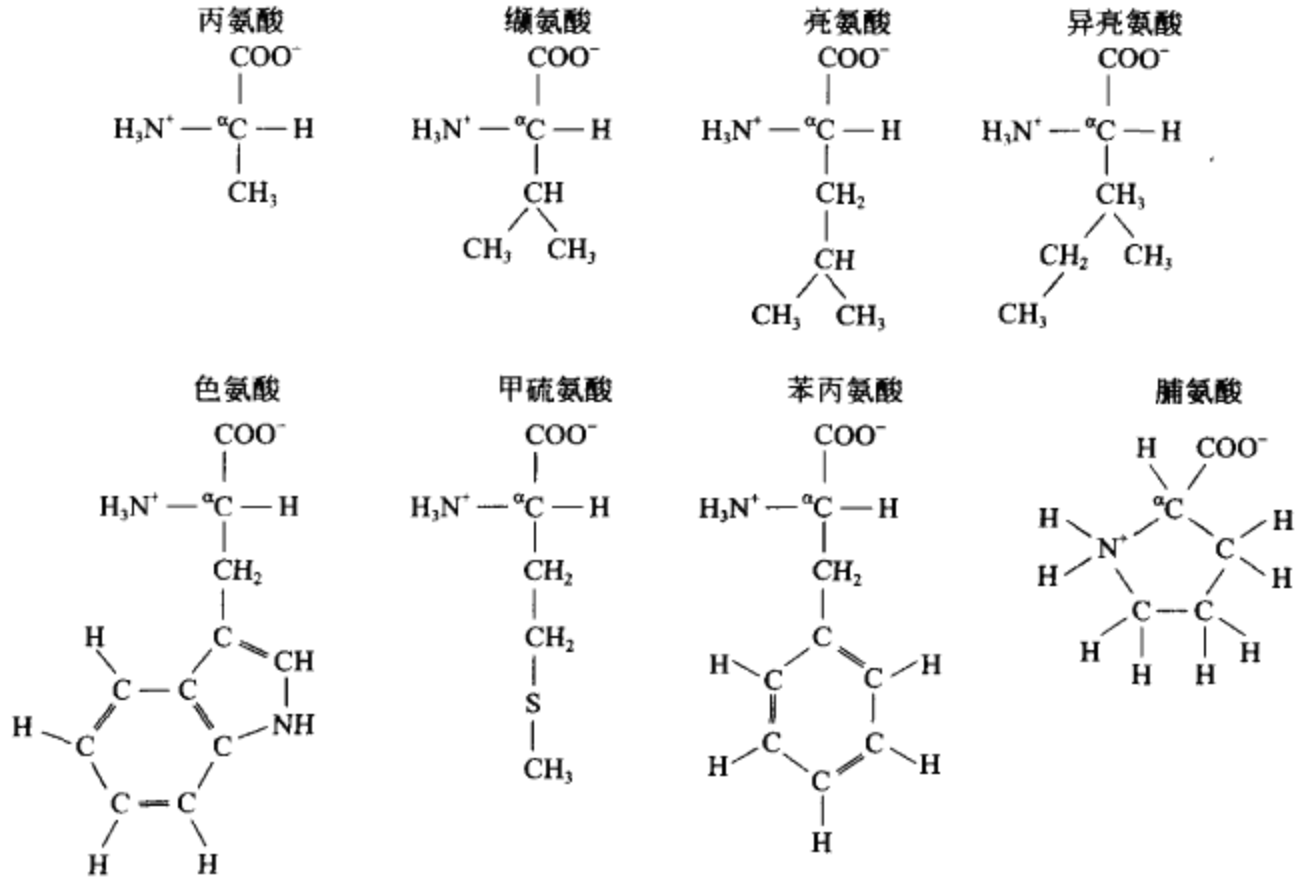


图 3.18　8 种疏水性氨基酸的分子结构

形成有序的水分子层，这样会吸引周围的水分子离开蛋白质分子，使蛋白质分子表面的疏水结构域暴露。由于离子强度的增加能增强蛋白质分子的表面疏水作用，因此疏水作用层析经常在盐沉淀步骤或者是离子交换层析之后进行。

并非所有的离子溶液对促进疏水作用同样有效。阴离子可以按增强盐出效应即促进疏水作用的能力的强弱排序。

盐出效应增强→

阴离子：SCN^-，I^-，ClO_4^-，NO_3^-，Br^-，Cl^-，CH_3COO^-，SO_4^{2-}，PO_4^{3-}

阳离子一般按增强离液效应排序，即提高破坏水结构的趋向。离液效应的增加导致疏水作用强度的降低。

离液效应增强→

阳离子：NH_4^+，Rb^+，K^+，Na^+，Cs^+，Li^+，Mg^{2+}，Ca^{2+}，Ba^{2+}

因此蛋白质样品最好在高离子强度条件下上样疏水作用柱，当溶液通过柱子时蛋白质通过疏水作用被保留。蛋白质疏水性越强，结合越牢固。经过一步冲洗，利用促使疏水作用减弱的条件洗脱结合的蛋白质。通过降低缓冲液离子强度、加入适当去污剂或加入乙醇或乙二醇等制剂降低缓冲液极性可以实现洗脱。蛋白质洗脱之后疏水作用层析树脂必须充分冲洗以除去任何紧密结合的蛋白质。除去紧密结合蛋白质首先需要用十二烷基磺酸钠等去污剂冲洗，然后通常用乙醇、丁醇和水等清洗。

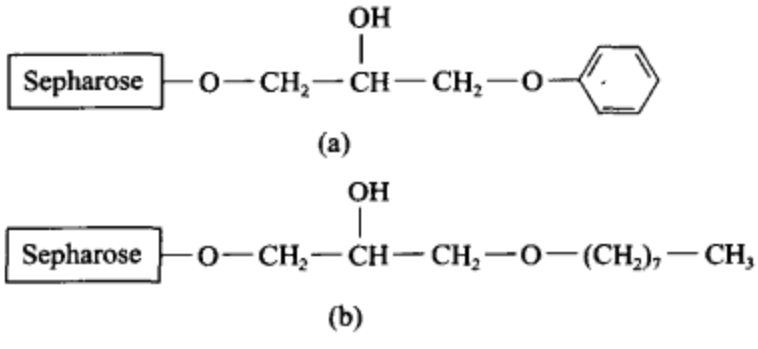


图 3.19
(a) 苯基-Sepharose 和 (b) 辛基-Sepharose 的化学结构，广泛应用于疏水作用层析

根据疏水性的不同也可以利用反向层析分离蛋白质。蛋白质溶液上样于多数蛋白质都结

合的高度疏水的柱子，降低流动相的极性可以洗脱结合蛋白质。通常是通过加入有机溶剂来降低流动相极性。洗脱条件苛刻，经常导致很多蛋白质变性。

3.5.4 亲和层析

亲和层析经常被称作是现有的纯化蛋白质最有效的高度选择性的方法。亲和层析的技术基础是多数蛋白质都能与其他化合物（经常称作配基）特异地而且可逆地结合（图 3.20）。多种配基可以和惰性支持基质共价结合，然后装填成层析柱，在此系统中，只有选择性地与固定配基结合的蛋白质分子才能保留在柱子上，用适当缓冲液冲洗柱子可以洗下所有未结合的分子。适当改变缓冲液的成分如加入竞争性配基可以使保留的蛋白质解吸附。

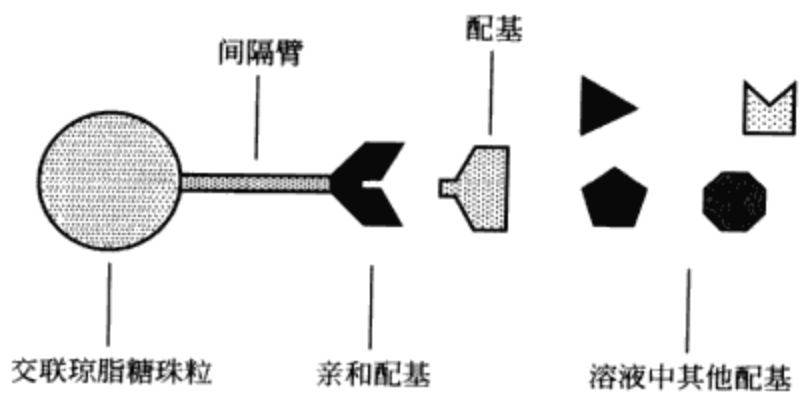


图 3.20 生物特异亲和层析原理示意图

选择的亲和配基通过适当的间隔臂化学连接到支持介质（琼脂糖珠粒）上。溶液中只有对固化配基有特异的生物亲和性的配基才能保留在柱子上

已经用来选择性纯化蛋白质的配基种类繁多（表 3.8）。正如名字所暗示的，生物特异亲和配基与目标蛋白特异作用。根据可以达到的特异程度可以再分为特异配基或普通配基层析。以染料亲和层析为典型的伪亲和层析所用的配基与蛋白质之间的作用生物特异性非常低；实际上这种作用真正的原理常常并不很清楚。

表 3.8 纯化蛋白质的各种形式的亲和层析

分　类	简　介
生物特异亲和层析 特异配基方法	采用对目标蛋白具有高度生物特异性的配基，如使用高度特异的酶底物/底物类似物纯化酶，或者应用目标蛋白抗体（免疫亲和层析）
生物特异亲和层析 普通配基方法	使用的配基能结合特定的一类蛋白质或蛋白质家族；如使用固化 NAD^+ 纯化 NAD^+ 依赖的脱氢酶，或使用固化凝集素纯化某些糖蛋白
假亲和层析	使用的配基可以结合各种蛋白质，但是作用方式不是生物特异的；如染料亲和层析

生物特异亲和层析

在设计纯化各种 ATP 或辅因子结合酶的亲和系统中，使用固化 ATP 或辅因子烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide，NAD^+），或者使用固化凝集素纯化糖蛋白（参见下文）是普通配基层析的典型例子。这类系统的一个优点是同一种亲和凝胶可以用来纯化一系列不同的蛋白质，但是达到的选择性程度远在特异配基方法之下。这种方法所用的配基除了与目标蛋白特异作用的抗体外还有酶底物、底物类似物或抑制剂。

解释特异配基亲和层析这个概念的一个极其精彩的例子是用固化草氨酸亲和柱纯化乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）（图 3.21）。草氨酸是丙酮酸结构类似物，是 LDH 的底物。LDH 催化的反应可以表示为

$$\text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \overset{\text{LDH}}{\rightleftharpoons} \text{乳酸} + \text{NAD}^+$$

乳酸脱氢酶显示出一种有序的动力学机制，酶必须首先结合还原型 NAD（NADH），之后才能结合丙酮酸或草氨酸。如果除去 NADH，酶将不再结合底物。

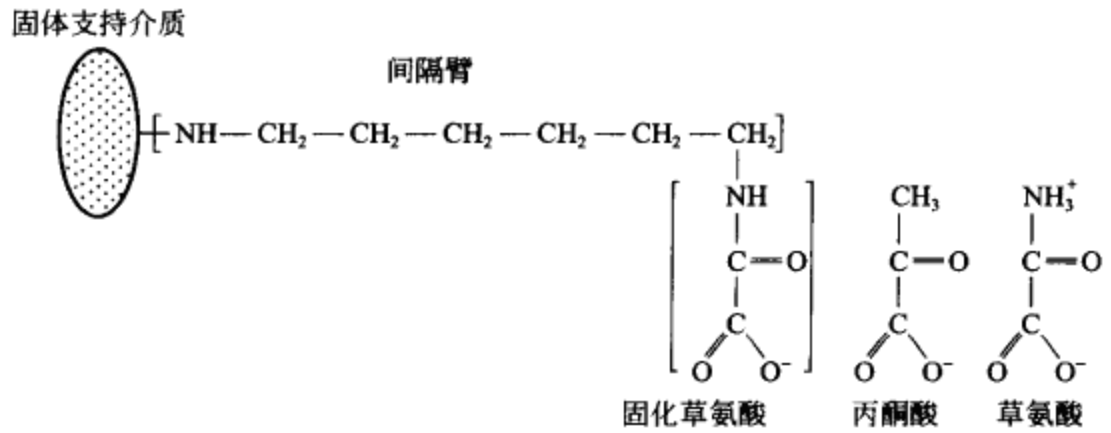


图 3.21　亲和纯化乳酸脱氢酶所用的丙酮酸、草氨酸和固化草氨酸的结构关系

在含 LDH 的粗酶制剂流过草氨酸柱之前加入 NADH，可以促进 LDH 与固化草氨酸的结合，其他所有蛋白质分子穿过柱子而不结合。上样之后用缓冲液冲洗柱子，确保洗掉所有未结合分子。只要冲洗缓冲液含有 NADH，LDH 分子就保持与柱子的吸附。用不含 NADH 的洗脱缓冲液冲洗，使酶立刻洗脱。用这种亲和柱只要一步就能从人胎盘粗提物中纯化出均一的 LDH，产量超过 98%。

合成任何亲和凝胶都要考虑以下 3 个主要问题：

① 亲和配基的选择；

② 支持基质的选择；

③ 化学偶联技术的选择。

选择的配基理想上应该对目标蛋白具有高度特异性，并且与目标蛋白的结合是可逆的，以便在相对温和的条件下实现解吸附。配基还应相当稳定，因为将配基化学偶联到支持基质上常常要求很苛刻的条件。正如已经提到的，许多生物大分子已成功用作亲和配体。但是其中多数配体都有局限性，包括成本高和稳定性低。开发出能结合多种蛋白质的合成染料配基克服了许多上述缺点。

使用的支持基质应具备以下特点：

① 物理和化学稳定；

② 刚性强，能承受高的工作流速；

③ 化学惰性，不与蛋白质非特异结合；

④ 高度渗水性，孔径足够蛋白质分子自由进入与内部的结合配基结合，大大提高柱结合能力；

⑤ 还必须可衍生、便宜和可重复利用。

使用的支持基质有琼脂糖、纤维素、硅胶和各种有机聚合物。交联琼脂糖可能是应用最广泛的基质。

可以将配基偶联到基质上的化学固化技术种类繁多。很多情况下配基并不是直接偶联到支持基质上，而是通过一个间隔臂偶联。可以使用的间隔臂有很多种，最普遍的完全由亚甲基组成（图 3.21）。很多情况下使用间隔臂的目的是克服妨碍大的蛋白质分子结合的位阻效应。可以使用一系列化学手段激活基质，产生化学不稳定的因而有活性的支持基质。随后用选择的配基衍生，或者首先用间隔臂衍生然后再偶联配基。用溴化氰激活是最早发明的激活基质的方法之一，溴化氰激活的琼脂糖在种类繁多的含伯氨基配基的固化中仍广泛使用。但是产生的配基在中性 pH 值时带正电荷，使凝胶具有离子交换的特性。在一定条件下偶联键也容易水解，可能导致配基从柱子流失。之后发明了许多其他的激活方法，有些方法能产生

非常稳定的衍生凝胶。

改变洗脱缓冲液的组成，大大降低蛋白质与固化配基的亲和力，可以从亲和柱上洗脱结合的蛋白质。蛋白质与配基之间的作用是各种非共价作用，很多情况下只需要改变缓冲液的pH值、离子强度、加入去污剂或乙二醇等试剂降低溶液的极性就能够将蛋白质洗脱。另外还可以加入竞争性配基促进解吸附。常用的竞争性配基包括自由底物、底物类似物或辅因子。与改变缓冲液pH值或离子强度等普及方法相比，使用竞争性配基通常使蛋白质的吸附更具选择性。有时可能需要多种洗脱条件组合才能实现洗脱，确定解吸附的最佳条件通常需要大量的实验研究。

亲和层析较常规的层析技术有许多优点。生物特异亲和层析的特异性和选择性是其他层析方法所不能比的，至少在实验室规模可以达到几乎100%的回收率，纯度提高1000倍以上。因而纳入亲和步骤可以大大减少纯化蛋白质所需要的步骤。当然也节约了可观的时间和成本，在工业上尤其显著。尽管有上述优势，生物特异亲和层析并不适合在工业上广泛应用，这一事实反映出此项技术的一系列缺点：

① 前面提到的许多生物特异配基都相当昂贵，而且常常不稳定；

② 许多配基偶联技术都很复杂、有毒、耗时和昂贵；

③ 由于以下两点，基质上偶联的配基的任何流失都应受到关注：a. 有效降低系统容量；b. 有害的化学物质渗漏到蛋白质产物中当然是不希望的，如果纯化蛋白质是用于商业用途更是如此。

由于粗成分中各种酶的活性可能修饰或降解昂贵的凝胶，选择生物特异亲和层析作为纯化蛋白质的第一步应非常谨慎，但是为了从它的高度特异性中得到最大益处，在纯化过程中应尽可能早地使用生物特异亲和层析。尽管有着巨大优势，但由于上述所有原因，传统的亲和系统在实验室研究之外应用很有限。

免疫亲和纯化

固化抗体可以用作亲和吸附剂，吸附相应的抗原（图3.22）。和许多其他生物分子一样，抗体可以通过各种化学偶联程序固定到适当的支持基质上。早期的许多免疫亲和柱使用的都是用纯化的抗原制备的哺乳动物多抗，因此设计免疫亲和柱的前提条件是必须有有效的纯化抗原的方案。使用多抗的免疫亲和柱结合目标蛋白的能力大多很低。另外，由于目标蛋白特异多抗在总的多抗中只占很小的一部分，这种柱子还会吸附其他一些蛋白质。

单克隆抗体技术可以大量生产只对靶抗原特异的抗体，促进了免疫亲和技术的应用。而且制备单克隆抗体不必充分纯化抗原蛋白。

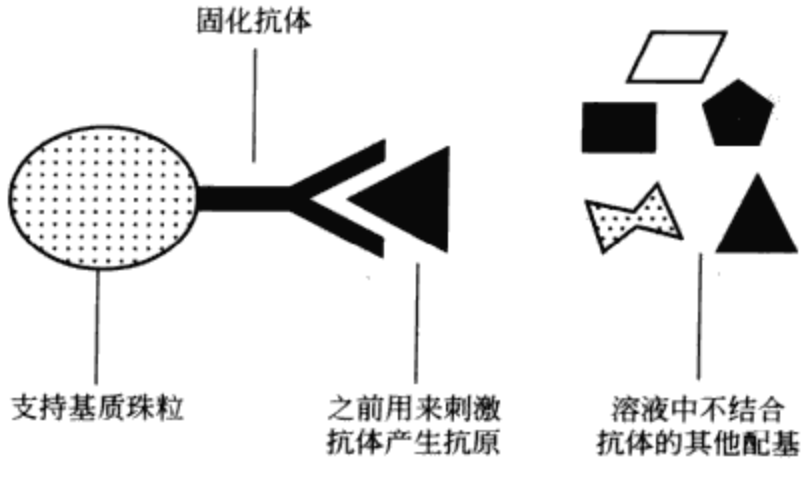


图3.22　免疫亲和层析原理

只有固化抗体特异识别的抗原保留在柱上

虽然免疫亲和层析可能是各种生物特异层析中特异性最高的，但是由于一系列原因其作为蛋白质纯化方法的普及还是拖延了。

① 同其他形式的亲和层析一样，免疫亲和层析是一项费用相对较高的技术。合适的单克隆抗体的制备和固化自然不是一项便宜的实验。

② 可能会出现不希望的配基（配体）流失。

③ 许多情况下，不容易实现结合蛋白从固化抗体的洗脱。解吸附要求的条件一般会导致结合蛋白的部分变性。调整缓冲液 pH，或使用尿素或胍等试剂常常可以实现洗脱。应用最普遍的洗脱方法之一是用 pH 2.2～2.8 的甘氨酸-盐酸缓冲液冲洗。有时在碱性 pH 值更容易洗脱。也有一些特例，蛋白质是在相对温和的条件下洗脱的，如更换缓冲系统或提高离子强度，但是这样的例子是例外。

尽管有着这样的缺点，免疫层析确实是具有极高的生物特异性，而且在实验室和工业规模都有应用。此项技术在工业上应用的一个例子是治疗血友病的重组血液因子Ⅷ的纯化，其中就有一步免疫亲和层析。

1. A 蛋白层析

多数种类的金黄色葡萄球菌都产生一种称作 A 蛋白的蛋白质。这种蛋白只有一条分子质量为 42ku 的多肽链。A 蛋白与人或许多其他哺乳动物免疫球蛋白 G（immunoglobulin，IgG）的 Fc 区（恒定区）结合，结合的特异性和亲和力都非常高。A 蛋白固化到 Sephadex 或琼脂糖珠粒上，构成一个强效的亲和系统，可以用来纯化 IgG。但是 A 蛋白对不同哺乳动物来源的各种 IgG 亚类的结合力有非常大的差别。有些情况下可以用另一个蛋白质 G 蛋白替代 A 蛋白。多数免疫球蛋白分子都是在碱性条件下与固化 A 蛋白结合，然后在酸性 pH 值下洗脱。在纯化具有很高价值的预期用于诊断或治疗的抗体方面，A 蛋白亲和层析有巨大的工业应用潜力。

2. 凝集素亲和层析

凝集素亲和层析可以用于纯化各种糖蛋白。最初研究凝集素是因为它们能促进红细胞和一些其他类型细胞凝集。凝集素是植物、脊椎动物和一些无脊椎动物合成的一组蛋白质。各种植物种子中凝集素含量尤其高。植物凝集素也常称作植物血球凝集素。所有凝集素都能结合某些单糖（如 α-D-甘露糖，α-D-葡萄糖，D-*N*-乙酰半乳糖苷）（表 3.9）。最为熟悉、应用最广泛的凝集素是伴刀豆球蛋白 A（concanowalin，Con A）、大豆凝集素（soybean lectin，SBL）和麦芽凝集素（wheat germ agglutinin，WGA）。

表 3.9　纯化糖蛋白常用的固化形式的凝集素

凝集素	来源	糖特异性	洗脱糖
Con A	刀豆种子	α-D-甘露糖，α-D-葡萄糖	α-D-甲基甘露糖
WGA	麦芽	*N*-乙酰基-β-D-葡糖胺	*N*-乙酰基-β-D-葡糖胺
PSA	豌豆	α-D-甘露糖	α-D-甲基甘露糖
LEL	西红柿	*N*-乙酰基-β-D-葡糖胺	*N*-乙酰基-β-D-葡糖胺
STL	马铃薯块茎	*N*-乙酰基-β-D-葡糖胺	*N*-乙酰基-β-D-葡糖胺
PHA	红芸豆	*N*-乙酰基-D-葡糖胺	*N*-乙酰基-D-葡糖胺
ELB	接骨木树皮	唾液酸或 *N*-乙酰基-D-葡糖胺	乳糖
GNL	雪花莲鳞茎	α-1→3-甘露糖	α-甲基甘露糖
AAA	淡水鳗	α-L-海藻糖	L-海藻糖

凝集素亲和层析可以用于纯化各种蛋白质，包括各种激素、生长因子和细胞因子。糖蛋白一般在接近中性 pH 值结合凝集素亲和柱。有时改变洗脱缓冲液 pH 可以解吸附。但是最普通的解吸附方法是在洗脱缓冲液中加入对凝集素具有高亲和性的自由糖分子，即加入竞争性配基。

尽管凝集素亲和层析可以用来纯化各种糖蛋白，但是由于以下原因尚未得到广泛应用：

① 多数凝集素都相当昂贵。

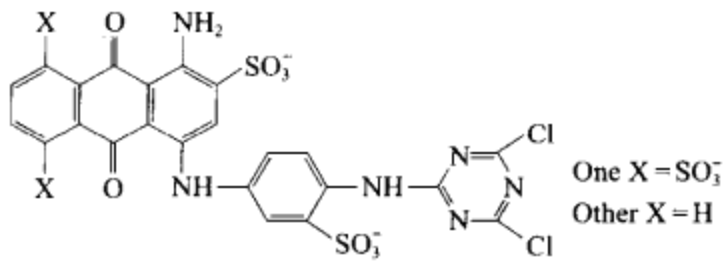
② 含某一种糖蛋白的粗蛋白原料通常都含多种糖蛋白。在这种情况下凝集素亲和系统会导致其中数种糖蛋白共纯化。

③ 有限的应用意味着这种方法几乎没什么成就，尤其在生产规模。

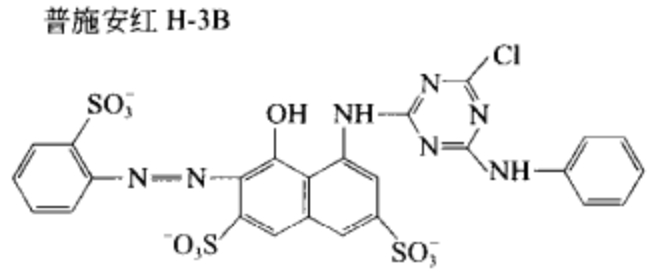
3. 染料亲和层析

在利用蓝葡聚糖进行凝胶过滤时，发现一些蛋白质表现出反常的洗脱性质，由此促进了染料亲和层析的发展。蓝葡聚糖是由一种三嗪染料（辛巴蓝 F3G-A）共价结合到高分子基质葡聚糖上形成的，经常用于测定凝胶柱的空隙体积。三嗪染料可以与一些蛋白质结合，这个发现导致了它被固定到一种琼脂糖凝胶上作为亲和配基使用。一些其他种类的三嗪染料（图 3.23）也结合一些特定的蛋白质，因此也用做亲和配基。染料亲和层析由于以下一系列的原因而开始被普遍使用：

普施安蓝 MX3G



普施安红 H-3B



普施安黄 H-A

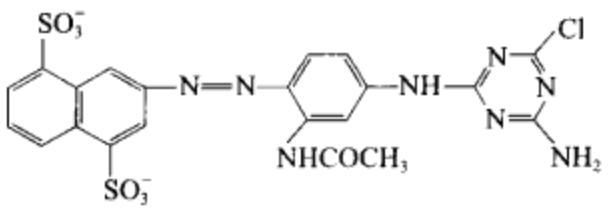


图 3.23　染料亲和层析常用的一些单氯三嗪和二氯三嗪染料亲和配基

① 染料易大量提供，而且价格相对便宜；

② 染料与基质的化学结合通常比较稳定，一般仅需要提高温度在碱性条件下进行孵育即可，可以避免使用 CNBr 等有毒化学试剂，在许多情况下也不需要结合空间；

③ 染料与基质的连接可以相对抵抗化学、物理和酶的降解，这种方式使柱中配基丢失的可能性降到最低，而且一旦发生配基丢失，由于染料颜色的改变很容易发现；

④ 蛋白质与固定化染料配基的结合能力很强，而且这种结合一般具有生物特异性；

⑤ 吸附蛋白质的洗脱相对容易实现。

一个问题是，这种大量生产和制备的纺织染料通常含有许多杂质，而这些杂质也许会对层析柱的性质有负面影响。不可能对一种特定的蛋白质是否能保留在染料亲和层析柱上，以及实现最佳吸附和洗脱的条件进行精确预测，只能根据经验性的研究判断，现在许多公司都提供一些包含许多不同的染料亲和配基的试剂盒，这些染料也许就是最初用于经验性研究的染料亲和配基，许多明显不相关的蛋白质可以结合染料亲和配基，而其他蛋白质则不能保留在亲和柱上，这种特异反应的作用原理还不清楚。由于自然界中不存在活性染料，不可能发生染料与蛋白质分子之间真正特异性的结合。然而这些染料与核苷酸辅酶（如 NADH）结构类似，因此经常可以结合脱氢酶，X 射线晶体学研究证实结合发生在这些依赖核苷酸的酶类与核苷酸的交叠处，因而相应的这些染料在很大的范围内用于纯化脱氢酶。这些染料也结

合一些与依赖核苷酸酶类无关联的蛋白质，这种特异性结合的机理还不清楚。带有负电荷的磺酸基团可以赋予这种三嗪染料以离子交换的特点，这些染料带有的芳香族基团使它们具有一定程度的疏水性，而疏水性在蛋白质吸附中也起到了一些作用，另外染料与蛋白质分子间也存在氢键结合。

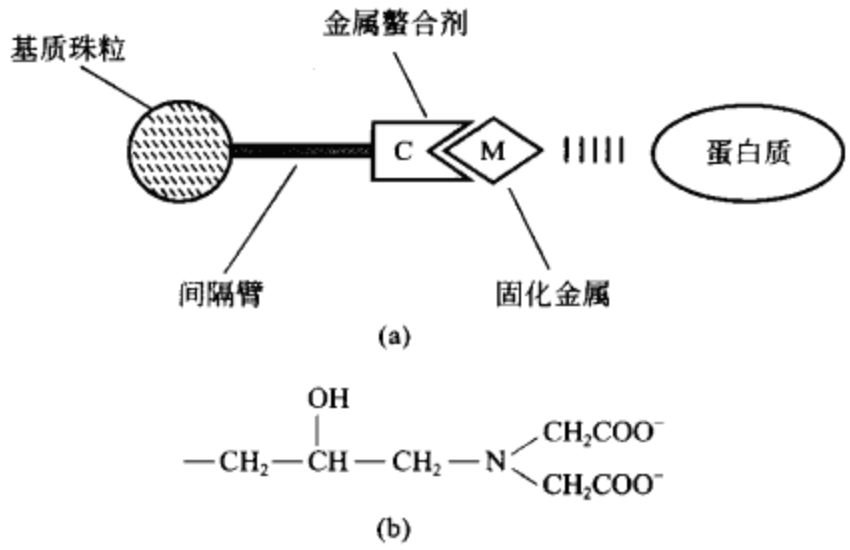


图 3.24　金属螯合层析基本原理示意图

(a) 某些蛋白质因与固定化的金属离子形成配位键而保留在层析柱上；(b) 最常用的金属螯合剂亚胺二乙酸 (iminodiaceticacid，IDA) 的结构

4. 金属螯合层析

金属螯合层析是 20 世纪 70 年代发展起来的非常规的蛋白质亲和层析纯化技术，主要依靠蛋白质表面的基团与固定在层析介质上的金属离子间形成配位键来实现吸附作用（图 3.24），金属螯合剂通过间隔臂与层析基质（如交联琼脂糖）共价连接形成亲和介质，螯合配体如亚胺二乙酸 (iminodiacetate，IDA) 能结合一些金属离子（如 Fe，Co，Ni，Cu，Zn，Al），并能有效地将其固定到层析基质上。亲和基质一般不提供与之结合的金属离子，因此可以选择金属离子与之螯合（用该金属的盐溶液平衡柱子，如在选择 Cu^{2+} 时用 $CuSO_4$ 溶液即可），最常用的金属离子有 Zn^{2+}，Ni^{2+} 和 Cu^{2+}。蛋白质表面的基团中，主要是组氨酸残基的侧链与金属离子形成弱的配位键。结合蛋白的洗脱在低 pH 的缓冲体系中进行（这能导致组氨酸残基质子化，从而使其与金属离子间的配位键不能形成），或者在洗脱缓冲液中加入一种强的竞争性的配体（如螯合配体，EDTA）。

金属螯合层析广泛用于纯化带有组氨酸标签（后文详述）的重组蛋白，由于蛋白质的结合是通过组氨酸残基实现的，这项技术不仅可以纯化含有金属的蛋白质，也可以分离不含金属的蛋白质。

3.5.5　羟基磷灰石层析

自然界中的羟基磷灰石存在于磷酸盐矿石中，也是骨骼中的矿物质之一，它同时也可以用于批量分馏或柱层析分离蛋白质。

将 Na_2HPO_4 和 $CaCl_2$ 混合在一起制备羟基磷灰石，这时会出现一种名为透磷钙石的白色沉淀，在氨存在的条件下加热至 100℃ 透磷钙石就转变为羟基磷灰石。尽管羟基磷灰石可以购买到，但是自己制备还是相对比较容易。

$$\underset{\text{透磷钙石}}{CaHPO_4 \cdot 2H_2O}\ ^{❶} \xrightarrow{\text{加热 } 100℃} \underset{\text{羟基磷灰石}}{Ca_{10}(PO_4)_6 \cdot (OH)_2}$$

现在对羟基磷灰石结合和分离蛋白质的真实机制还了解得不多，蛋白质与 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 发生双重相互作用而吸附在羟基磷灰石基质上，结合蛋白在层析柱上的解离一般是通过磷酸钾梯度洗脱实现的。

---

❶ 原著为 $Ca_2HPO_4 \cdot 2H_2O$，疑有误，更正为 $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$——译者注。

磷酸钙-纤维素凝胶代表了羟基磷灰石柱层析的一种演变，将磷酸钙的悬液与纤维素粉的悬液一起孵育，就产生了这种纤维素外包被磷酸钙的凝胶。

羟基磷灰石层析一般不是经常使用，可能很大程度上是因为其他柱层析方法分离蛋白质的原理更清楚。羟基磷灰石的制备尽管很简单，但仍然带来额外的不便，有时不同批次的羟基磷灰石的层析特性会不同。

3.5.6 聚焦层析

聚焦层析根据等电点来分离蛋白质，是一种相对较新的层析技术。在聚焦层析中，先用一种 pH 值的缓冲液平衡离子交换柱，再用另外一种不同 pH 值的缓冲液流过柱子，由于交换剂本身的缓冲能力，一个连续的 pH 梯度就可以沿着层析柱形成。为了获得最大的分辨率，必须建立一个线性的 pH 梯度，这就要求使用的洗涤缓冲液和交换剂必须在很大的 pH 值范围内具有缓冲能力，所形成的 pH 梯度的范围明显依赖于预平衡后离子交换剂的 pH 值和洗涤缓冲液的 pH 值。聚焦层析最常使用的基质为表现出很强缓冲能力的弱阴离子交换剂，这种弱阴离子交换剂首先用高 pH 值的缓冲液预平衡，然后上样，上样通常在 pH 值低于预缓冲液的上样缓冲液中进行。上样完毕后，用一种特殊配方的含有大量缓冲成分的缓冲液（商品化）淋洗柱子，由于相对于层析柱原始的 pH 值偏低，这种缓冲液使层析柱形成从上到下逐渐上升的 pH 梯度。

上样以后，带负电荷的蛋白质立刻结合到层析柱，带正电荷的蛋白质沿柱下行，由于层析柱中存在上升的 pH 梯度，这些带正电荷的蛋白质最终将会到达柱中的 pH 值与其 pI 值（等电点）相等处，继续向下迁移，由于环境 pH 值高于其 pI 值，这些蛋白质将会因为带上负电荷而结合到层析柱上。因此，由于最初洗涤缓冲液的使用，所有的蛋白质组分都会沿柱下行，直到它们到达柱中的 pH 值略大于其等电点处，此时它们将会结合到阴离子交换剂上，不同的蛋白质组分由于其等电点这一参数的区别而分离开。柱中所形成的 pH 梯度不是静态的，随着更多洗涤缓冲液的使用，柱中任何一点的 pH 值都会不断地下降，因此，当环境 pH 值再次低于其 pI 值时，吸附在柱子上的蛋白质开始带上正电荷，从而将会立刻解离。解离的蛋白质沿柱下行，直到它们到达柱中的 pH 值略大于其等电点处，然后重新结合。这个过程将会反复进行，直至蛋白质在自己的等电点处从柱子上洗脱下来。目标蛋白的等电点（pI 值）处于 pH 梯度中间时最为理想，结果将会最好。聚焦层析时结合蛋白的洗脱峰较窄，具有非常好的分离效果。这项技术和其他层析方法在纯化蛋白质时结合使用，尤其有效。应用方面的大多数报道还仍是仅限于实验室的技术手段规模，由于经济方面的原因，尤其是所需要的洗涤液的费用限制了其在工业上的大规模应用。

3.5.7 基于双水相分离的蛋白质层析

前面已经提过，蛋白质在双水相系统中的分离代表了一种传统的可以在一定程度上纯化蛋白质的方法，这种技术可以在柱层析中使用，建立液-液分离柱需要选择合适的支持剂，以吸附两种互不相溶的溶剂中的一种，从而形成层析柱中的固定相，第二相（流动相）沿层析柱流过。蛋白质在两相溶剂中的分离依赖于它们与两种溶剂的相对亲和力，与流动相的亲和力较高的蛋白质先洗脱下来，而那些和固定相作用较强的蛋白质，洗脱速度要慢得多。

一般使用的支持剂与形成聚合物的两相中的一相不相溶，支持剂排斥不相溶的聚合物，而其自身被另一相包被，有效地隔离了不相溶的一相。纤维素与PEG不相溶，在PEG-葡聚糖两相溶剂系统中被葡聚糖所包被。但是，由于其致密的纤维结构，这种体系的容量相对较小。含有丰富葡聚糖的液相也可以用来包被聚丙烯酰胺支持剂，然而，聚丙烯酰胺凝胶珠在葡聚糖存在的条件下易于膨胀，膨胀后的颗粒机械强度较差，在低压下就会破碎，这就在一些方面限制了聚丙烯酰胺体系的应用。

另外一种方法就是设计一种稳定的适用于双水相分离层析的支持剂，如通过连接聚合反应，将线性的聚丙烯酰胺链固定在一种合适的珠状支持剂表面，这种方法得到的凝胶珠机械强度大，易于被富含葡聚糖的液相包被。聚丙烯酰胺可以成功连接的支持剂包括二氧化硅和聚丙烯酸酯烯类聚合物。双水相分离层析不仅可以分离蛋白质，也可以用来分离核酸。

3.5.8　蛋白质的高效液相层析

迄今为止，前面提到的层析技术都是在由重力或低压泵产生的相对较低的压力下进行的(低压液相层析，low pressure liquid chromatography，LPLC)，在这样的层析柱上分离一个单独的样品一般都需要几个小时的时间来完成，而且必须保持相对较低的流速。这是因为当样品流经层析柱时，蛋白质因流过凝胶颗粒表面而开始接触，蛋白质分子完全依靠分子扩散进入多孔凝胶颗粒内部，这是一个很慢的过程，尤其是与蛋白质样品只在凝胶颗粒表面迁移相比。如果流速显著高于通常的扩散速度，就会导致带扩展（分辨率就会下降）。这种现象的发生是因为对于同一种分子而言，没有进入凝胶颗粒内的分子流经层析柱的速度较快，进入颗粒内的分子流速较慢。高的流速导致许多分子在经过层析柱时没有机会扩散到凝胶颗粒内部，从而降低吸附容量。

一个提高流速而又不降低分辨率的方法就是使用直径非常小的微粒固定相基质，这能有效地降低分子扩散出入介质颗粒的时间。颗粒直径的急剧降低增加了保持既定流速所需的压力，这样高的流速可以通过高效液相层析系统（high pressure liquid chromatography，HPLC）来实现。利用这样的方法，分离样品所需要的时间可以从几个小时降为几十分钟。由于处理时间的减少，制备HPLC在工业上已经引起了极大的兴趣。尽管在这方面已经取得了很大的进步，制备HPLC系统在蛋白质纯化上还只是在相对限定的范围内使用。

能够在高压下提供恒定流速的泵的发展以及合适的抗压层析介质的识别大大提高了成功应用HPLC的可能性，传统的在低压下使用的较软的层析介质由于可压缩性均不适合在高压系统下使用。

一种理想的支持介质应该：

① 具有机械的和化学的稳定性；

② 非特异性吸附程度低；

③ 易重复使用；

④ 价格低廉；

⑤ 介质颗粒小，质地均匀；

⑥ 多孔性。

很明显没有任何一种材料可以满足以上所有条件，硅胶符合其中一些重要的规定，最为显著的是高机械稳定性，因此，它在高效液相层析系统中被广泛使用。但是，硅胶在碱性条

件下是不稳定的，除此之外，它还表现出一些非特异性吸附的性质。正是由于硅胶在碱性pH值下相对不稳定，在纯化重要的治疗用蛋白质（一种蛋白质的主要用途）方面的应用受到限制，比如现在使用较多的去热原（第4章）的方法就包括在层析柱中持续使用1mol/L的NaOH。硅胶的这些缺点可以通过在其颗粒表面包被合适的亲水层来克服。

许多有机聚合物如交联聚苯乙烯已经发展起来，成为除硅胶外的另一选择，尽管许多这样的物质具有更强的化学稳定性，但是它们的直径很难被生产的像平常使用的硅胶颗粒那么小。通常，HPLC的固相颗粒直径的范围为5～55μm，比低压液相层析使用的颗粒直径小10倍。

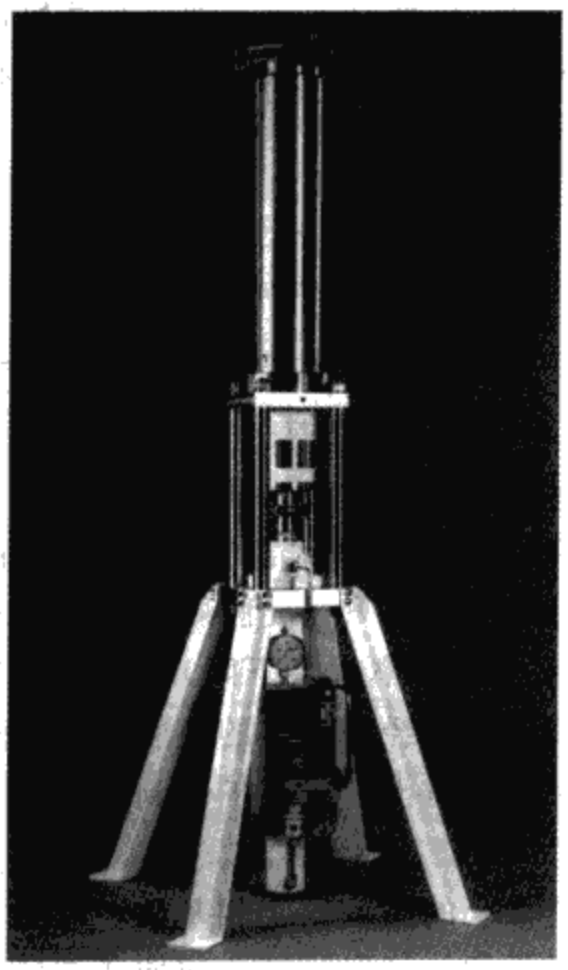


图3.25 处理治疗或诊断用蛋白质的制备HPLC柱（直径15cm）柱子由Prochrom（Nancy，France）制造（照片承蒙Affinity Chromatography有限公司允许使用）

在蛋白质纯化和鉴定时可以利用HPLC进行分析或制备。大多数分析用HPLC柱直径为4～4.6mm，长度为10～30cm，现在提供的制备用HPLC柱直径比较大，多超过80cm，长度超过1m（图3.25）。多种不同的化学基团都可以连接到介质颗粒上，因此，离子交换、凝胶过滤、亲和层析、疏水层析和反相层析等技术都适用于HPLC。

许多小分子量蛋白质，尤其是在细胞外发挥作用的蛋白质（如干扰素、生长激素以及许多不同种类的细胞因子）都非常稳定，可以在许多HPLC柱上进行分离而不会发生严重的变性或生物活性的降低。制备HPLC可以用于干扰素和白细胞介素2（interleukin-2，IL-2）的生产规模纯化。相反，许多较大的蛋白质（如血液因子Ⅷ）性质相对不太稳定，高压分离时可以观察到因蛋白质变性而导致活性丧失。

与低压层析技术相比，制备和分析水平的HPLC均表现出一些很重要的优势：

① 由于介质颗粒的变小，HPLC具有更高的分辨率。介质颗粒内的扩散距离变得最小，使洗脱峰比低压系统窄得多。

② 流速的提高使HPLC提供更快的分离速度，通常可由几个小时缩短到几十分钟。

③ HPLC易实现高度自动化。

HPLC最大的不足在于费用，次要的是容量。即使最基本的HPLC也比低压系统昂贵。日复一日地运行这样的系统所需要的溶剂和一次性物品也是非常昂贵的。在制备水平，HPLC的安装和维持费用必须与HPLC系统缩短纯化时间而节约的费用持平。在一些情况下，HPLC的柱容量也是一个决定性的因素，尽管一些现代化制备体系每个生产循环可以分离100g或更多的蛋白质。

出于技术和经济的原因，HPLC几乎专门用于下游处理少量体积的蛋白质，尤其是价值较高的预期主要用于治疗的蛋白质（图3.26）。分析HPLC更广泛应用于生物技术方面，它具有高分辨率，高灵敏度尤其是高的速度，从而为常规蛋白质纯化效果的评定和终产品的质量控制检查提供了一种合适的方法。在这些方面HPLC已经得到了广泛的应用，最为显著的是纯化用猪胰岛素半合成的人胰岛素，以及从微生物中纯化重组人胰岛素（见第7章）。

近期出现了一种相对于 HPLC 的替代产品，我们称之为 FPLC 或快速蛋白质液相层析，这项技术所使用的压力明显低于传统 HPLC 系统，这就允许使用琼脂糖等聚合物作为层析介质，FPLC 层析柱由玻璃或惰性塑料制成，传统的 HPLC 层析柱由高级不锈钢制造，从经济角度考虑，FPLC 系统比 HPLC 具有更大的吸引力。尽管 FPLC 在低压下进行，但是由于采用了比低压系统相对更高的流速，它们仍然具有很高的分辨率。基于 FPLC 技术的层析系统，如 Pharmacia 的 BioPilot 系统最适合用于较大规模的应用（如试点规模的研究或小规模生产），BioPilot 系统是一种利用 FPLC 技术的全自动液相层析系统（图 3.27），包括控制和分离单元。计算机控制单元可以控制流速、洗脱成分等参数以及控制 UV 监视器和绘图记录仪，检测并记录柱中蛋白质洗脱概况。分离装置包括全部的缓冲液储存系统以及层析柱。BioPilot 系统带有一些不同的层析分离柱，它们通过一系列连接管道和阀门连接。系统的柱体积可以达到 1ml～30L。众多不同类型的分离柱，如离子交换、凝胶过滤、疏水层析和亲和层析均适用于 FPLC 系统，其中的高精度泵允许的最大流速可以达到 100ml/min。

图 3.26　制备用高性能液相层析系统
由 Prochrom，Nancy，France 制造（照片承蒙 Affinity Chromatography 有限公司允许使用）

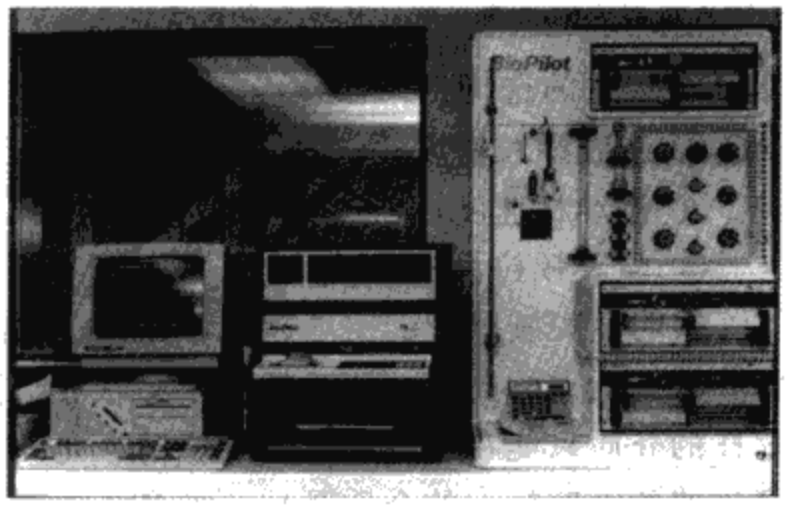


图 3.27　Pharmacia 公司生产的 BioPilot 系统
（照片承蒙 British Biotechnology 有限公司允许使用）

为了适应高价值蛋白质生产的需要，设计了自动化程度更高的层析体系。Pharmacia 的 BioProcess 系统由一个整体的控制面板、处理泵以及包含一些不同类型层析柱的分离单元组成，其流速可达 400L/h，每个生产循环可以纯化克级到千克级的蛋白质。和 BioPilot 系统一样，BioProcess 体系的设计可以承受严格的消毒处理，这对生产体内用诊断或治疗蛋白质是必须的（见第 4 章）。这种系统的高度自动化为整个生产过程的经济节约作出了巨大的贡献。

3.5.9　膨胀床层析

传统的蛋白质纯化程序需要在层析分离前从蛋白质样品中除去颗粒组分，这是因为固定相（凝胶介质）是非常紧密地填充到层析柱中的，带有颗粒组分（如完整的细胞或细胞碎片）的蛋白质样品在流经柱子时，会很快导致柱床表面附近形成堵塞，继而降低流速，提高背景压力。

膨胀床层析可以克服这个困难，它允许带有完整细胞或细胞碎片的含有目标蛋白的样品直接通过吸附层析柱，这就省去了最初的清除步骤，蛋白质纯化的过程将会更加便利，周期

也会缩短（图 3.28）。这个方法在实验室和工业生产阶段都是适用的，由于相应设备（如离心机，过滤设备）和生产时间的缩减可以转化成经济成本的降低，它的优势在大规模的工业生产上表现得更为明显，由此，膨胀床层析已经引起了工业部门最大兴趣。如图 3.29 所示，膨胀床层析的流动相向上通过分离柱，这样就使凝胶颗粒从开始的填充状态向上膨胀，带有颗粒组分的溶液可以直接通过而不会阻塞柱子。

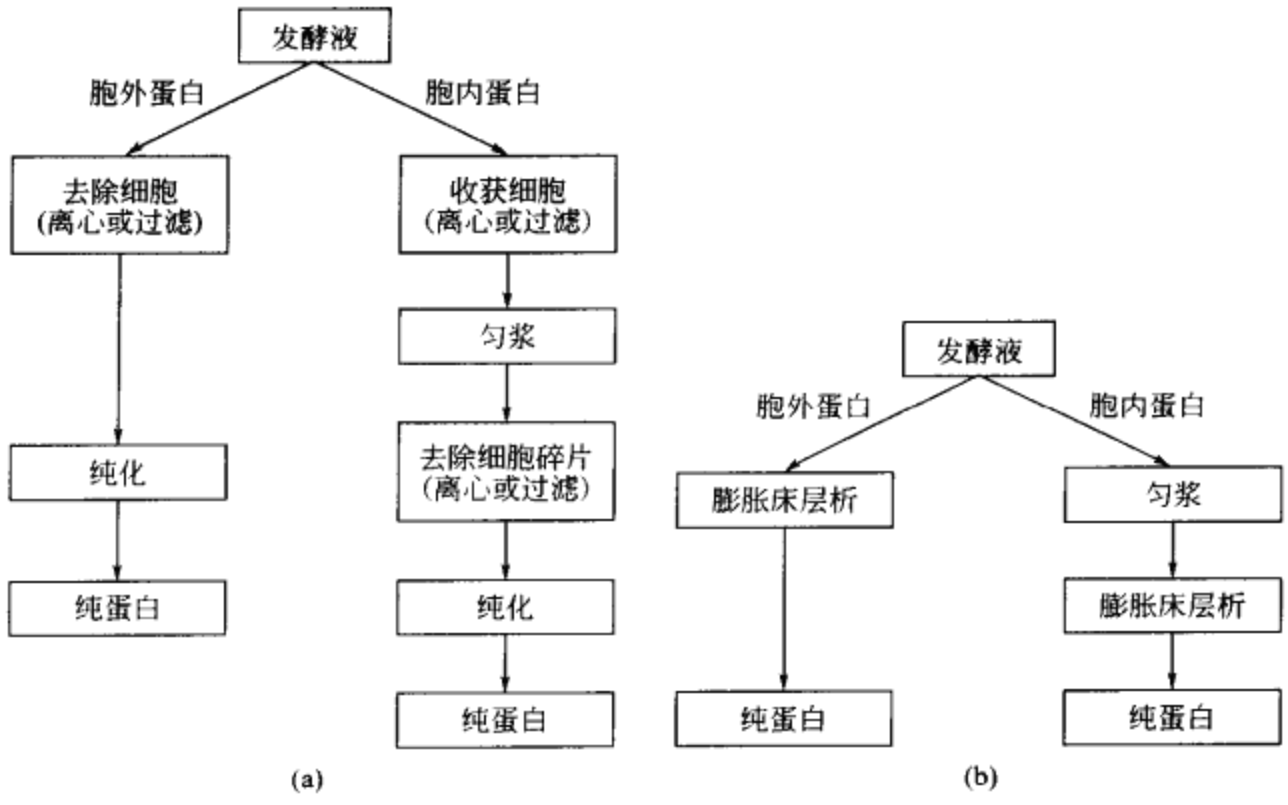


图 3.28

用传统柱层析（a）和膨胀床层析（b）纯化微生物蛋白的一般方案比较。详细内容参考正文

产生稳定的膨胀床［图 3.29（c）］需要以下几个慎重的选择：

① 凝胶颗粒密度；

② 流动相速度；

③ 凝胶颗粒大小。

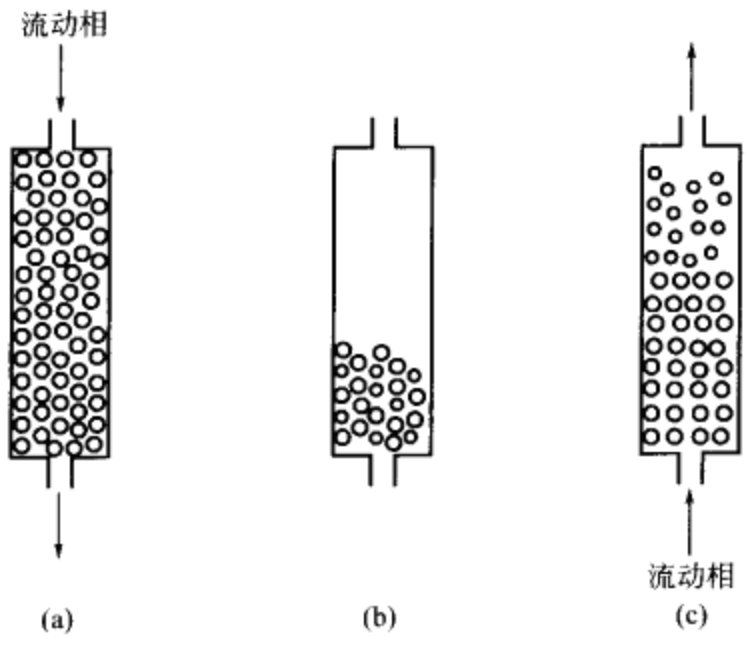


图 3.29　填充床层析和膨胀床层析比较简图

(a) 在填充床模式中，介质紧密地填充在柱子中，流动相向下流动；(b) 而膨胀床层析中开始装填的介质只占柱体积的一部分（经常是一半或更少）；(c) 流动相向上流动，促进凝胶颗粒的升高。这就保证流动相中的颗粒可以通过柱子而不会堵塞它。现在有一些特殊的介质应用于膨胀床层析，如正文中谈到的，它们的直径变化范围很大

很明显凝胶颗粒的密度越大，保持合适的膨胀状态所需的向上的流速越大，交联琼脂糖这样的介质只能在较低的流速下使用，允许更高流速的密度较大的介质颗粒，如多孔玻璃珠和含有全氟聚合物的介质颗粒已经发展起来。另外，现在还出现了合成的介质颗粒，它包含一个致密核心（如石英或多种金属），其外层被琼脂糖包被。研究证明密度为 1.1～1.3g/ml 的介质最适合于膨胀床模式，在介质颗粒上偶联一种合适的配基，膨胀床层析可以用于离子交换、疏水层析或亲和层析等纯化方式。

使用直径大小在合适范围内的介质颗粒也是形成稳定的膨胀床的一个中心环节，典型的颗粒直径约为 100～300μm。当其他参数（介质颗粒密度和流速）不变时，颗粒膨胀会导致

直径最大的介质颗粒留在柱底，而较小的颗粒则位于接近柱子顶部的地方［图 3.29（c）］，当到达平衡点时，这种分配能保证介质颗粒不在柱内垂直移动（在任何程度上），很显然这在层析时是非常重要的（传统的填充柱体系中，介质颗粒在直径上也是有一定差别的，但是这种情况下颗粒填充得非常紧密，无论如何没有垂直移动的空间）。

膨胀床层析所需要的设备与填充柱非常相似。柱子设计时被修饰得非常光滑，以保证样品在流经介质颗粒表面全部的交联部分时可以实现连续分布。为了方便柱床膨胀，柱顶部的配接器必须是可以移动的。

膨胀床层析的操作非常简单，最初的平衡缓冲液（也形成稳定的膨胀床）流过柱子，带有微小颗粒的样品上样，像平常一样发生选择性吸附，随后是冲洗步骤，这一操作将会除去样品中不结合的部分，包括其中所带的颗粒组分。洗脱可以以膨胀床的方式进行，但是，常常是在使用洗脱缓冲液之前就使介质颗粒沉淀下来（即柱子就转换成填充柱模式），柱体积变小从而促进了蛋白质的洗脱。越来越多的文献报道了成功利用膨胀床进行柱层析的实例，然而在实验室和工业生产上，这项技术还有待广泛应用。

3.5.10　膜层析

膜层析是一种替代传统填充柱方法的层析技术，这一点和膨胀床层析很相似。膜层析中，捕获配基偶联到微孔滤膜的孔内壁上（图 3.30），捕获配基可以针对特定蛋白的电荷、疏水性或生物特异性，可以进行离子交换、疏水层析或亲和层析（表 3.10）。

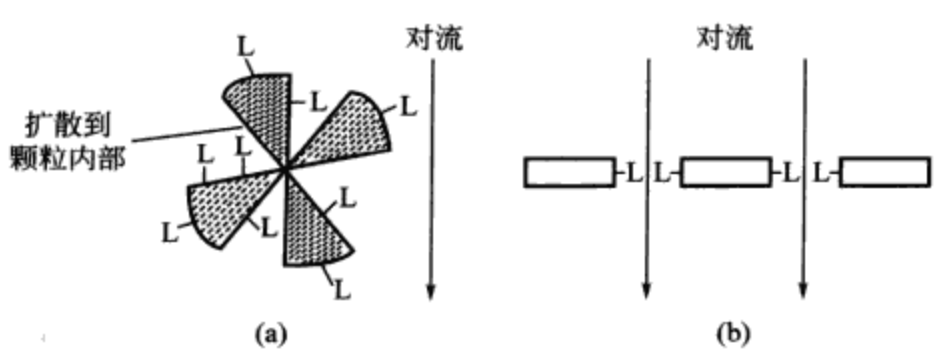


图 3.30　介质珠粒吸附层析与膜固定相层析

（a）图示层析介质珠粒的横切面。直向的迁移流带动流动相中的溶质（如蛋白质）与介质粒表面接触，但进入内部需要借助扩散；（b）图示层析膜的横切面，迁移流带动溶质与捕获配基接触

表 3.10　纯化方案中至少采用了一步膜层析的一些典型的蛋白质

纯化的蛋白质	膜上的捕获配基
牛血清白蛋白	离子交换剂
β-半乳糖苷酶	离子交换剂
α-胰凝乳蛋白酶原	离子交换剂
溶菌酶	离子交换剂
白细胞介素-1	离子交换剂
牛血清白蛋白	疏水性配基
卵清蛋白	疏水性配基
肿瘤坏死因子	疏水性配基
大豆胰酶抑制剂	疏水性配基
牛血清白蛋白	抗 BSA 抗体（免疫亲和）
人 IgG	A 蛋白（亲和）
白细胞介素-2	抗 IL-2 抗体（免疫亲和）
牛过氧化氢酶	辛巴蓝 F3GA（染料亲和）
细胞色素 c	IDA-Cu^{2+}（金属亲和）

与传统体系相比，膜层析的最大好处是提高了处理速度。在多孔介质颗粒存在的情况下，蛋白质通过直接的迁移流动与颗粒表面接触，但是，蛋白质分子必须通过低速的扩散过程才能经过偶联有大多数捕获配基的颗粒小孔（图 3.30），实际操作中这种扩散限制为柱层析使用的合适的流速设置了上限。而在膜层析中，带有目标蛋白的流动相仅通过迁移流与捕获配基相接触，这就允许操作系统使用较大的流速（一般比柱层析的速度大 10 倍以上），提高处理速度可以有力地缩短生产周期等，以避免目标蛋白可能与特殊有害的物质如蛋白酶发生接触，还可以使一些特定的不稳定性蛋白质的活性丧失程度降到最低。在工业生产阶段，提高处理速度将会节省时间，从而降低成本。

层析用膜可以用多种不同的材料制造，其中包括纤维素、改良纤维素、聚乙烯、尼龙以及丙烯酸合成物等。这种膜可以设计成各种形式，主要是平板、径向流动或中空纤维系统。

3.5.11 重组蛋白的纯化

利用 DNA 重组技术生产的蛋白质与非重组蛋白的纯化方法一般来说是一致的，实际上由于目标蛋白可以达到高水平的表达，重组蛋白的纯化可以更为简便，高表达可以提高目标蛋白相对于杂质的收率，去掉或减少起始浓缩步骤。如果重组蛋白表现出宿主天然蛋白所不具备的明确的理化性质，纯化也会变得简单，这已经通过在嗜常温生物，如 *E. coli* 中重组表达热稳定性非常高的蛋白质（超级嗜热蛋白的衍生物，见第 10 章）得到证明，将粗提物在 70～80℃加热几分钟，将会导致 *E. coli* 内天然蛋白质的降解和沉淀，通过离心除去沉淀后，溶液中剩余的是高纯度的重组蛋白。

重组蛋白的两个特征，形成包含体和带有纯化标签，可以显著影响随后所使用的纯化方法。包含体的形成、溶解和复性过程已经在第 2 章中讲述过了，读者可以在那儿查阅。一旦重组蛋白重折叠，其余的纯化（如果需要）按常规程序进行。

遗传工程技术也促成了在目标蛋白上连接一个特定的小肽或蛋白标签，所选择的标签赋予了融合蛋白一些明确的有利于随后纯化的理化性质。一般在编码目标蛋白遗传信息的序列后面融合一段编码标签的 DNA 序列就可以得到融合蛋白，标签使得融合蛋白可以利用离子交换、疏水层析或亲和层析等技术快速简便地得到纯化，已经设计出这样的标签并获得成功应用。

在蛋白质 C 端加入多聚精氨酸（或多聚赖氨酸），可使其带上强的正电荷，从而很容易用阳离子交换层析进行纯化，这种方法已经在纯化许多干扰素和尿抑胃素中得到应用。带有多个疏水性氨基酸的标签可以赋予融合蛋白很强的疏水性，可以利用疏水层析得到有效的纯化。带有多聚组氨酸的纯化标签的蛋白质可以用金属螯合层析进行纯化。

使蛋白质能够利用亲和层析进行纯化的标签已经发展起来，编码 A 蛋白的基因序列可以与目标蛋白的基因或 cDNA 序列融合，得到的融合蛋白可以利用带有固定化 IgG 的层析柱进行纯化。如果抗体可以和亲和标签反应，就可利用免疫亲和层析进行纯化，一种名为 Flag 的合成肽已经发展成为特定的亲和层析标签，它上面带有肠激酶的识别位点，特异性识别 Flag 的单克隆抗体也已经制备，其中的一种已经鉴定，它被固定到层析介质上，在特定的条件下可以允许 Flag-蛋白质的解离。多种酶也可以被用做纯化

标签，使用β-半乳糖苷酶尤其普遍，因为这种亲和层析系统制备容易，从而使纯化较为便利。

融合蛋白纯化以后通常要去掉标签，如果蛋白质是用于治疗，由于标签本身是一种免疫原，这一步就尤其关键。通常使用化学裂解或酶作用去掉标签，这通过在标签序列中设计特异性的蛋白酶或化学试剂的裂解位点来实现，裂解位点位于目标蛋白和标签的融合处。经常用于去掉标签的序列特异性的蛋白酶包括内肽酶如胰蛋白酶、Xa因子和肠激酶，外肽酶如羧肽酶A有时也会使用，一般来说断裂蛋白质内源性肽键的内肽酶经常用于去掉较长的标签，而外肽酶多用于去掉短的标签，以羧肽酶A为例，它从蛋白质的C端逐个去掉氨基酸残基直到遇到Lys、Arg或Pro残基为止。化学断裂特异性的肽键需要使用如溴化氰或羟胺这样的化学试剂。

尽管用一些方法可以去掉标签，大多数这样的方法都存在一些固有的缺点，任何一种方法的必要的先决条件就是在断裂去掉标签后仍是完整无缺的，因此目标蛋白不能含有任何对所选择的特异性方法敏感的暴露（表面）肽键。以化学方法为例，它必须在较为苛刻的条件下进行，经常需要高温或极端的pH值，这样的条件能够对蛋白质的正常功能造成负面影响。蛋白酶解去掉标签经常不能达到百分之百的效率。选择性地断裂标签后，随之而来的就是标签和目标蛋白的分离，这也许需要另外的层析步骤。

3.6　蛋白质的失活和稳定性

很多种影响因素都可以导致蛋白质生物活性的丧失，这些影响因素可以是自然界中化学的、物理的或者生物的因素，可以通过沉淀、共价修饰或部分降解等方法破坏其生物活性（表3.11）。换句话说，任何改变蛋白质天然结构的影响因素都将可能影响到其生物学活性（绝大多数情况蛋白质的活性将会降低或丧失）。

表3.11　可导致蛋白质失活的多种化学、生物和物理因素

失活因素	实　例	注　释
化学因素	去垢剂、有机溶剂、离液剂、氧化剂、重金属	多通过干扰稳定蛋白质结构的共价/非共价键，从而导致蛋白质变性，一些试剂（如氧化剂）通过修饰蛋白质中维持生物活性的必需氨基酸使其失活
生物因素	蛋白水解酶、糖酶（糖蛋白）、磷酸酶（磷蛋白质）、污染的微生物	均通过水解共价键实现诱导蛋白质失活。微生物污染（如污染蛋白质储存液）通过产生降解酶类导致失活
物理因素	极端的温度或pH、冻融、剧烈搅拌	大多数通过导致变性使蛋白质失活

生物活性的丧失可能发生在从原材料中提取蛋白质的过程中，蛋白质纯化步骤中或纯化后，在蛋白质储存过程中。对于任何一种特定的失活因素，蛋白质之间敏感性的差别是非常大的，它们在特定环境中的相对稳定性或不稳定性最终依赖于它们的结构。

尽管有例外存在，作为一个基本的原则，胞外蛋白在本质上倾向于比胞内蛋白稳定得多，胞外蛋白已经进化为在很大程度上难以控制的胞外环境中发挥作用，另一方面，胞内蛋白多在可调节的环境下行使功能：

① 细胞内pH值一般保持在很窄的范围内（一般为pH6～7）。

② 细胞膜能调节物质进入细胞，以及细胞内分区（真核细胞）也能帮助不相容的生物分子间的隔离，例如溶酶体内有包括蛋白酶在内的多种水解酶类，而植物细胞的液泡中发现有很多可以导致蛋白质变性或具有修饰作用的化学物质。

③ 细胞内是一个不变的还原性环境，可以防止氧敏感性蛋白质的失活。

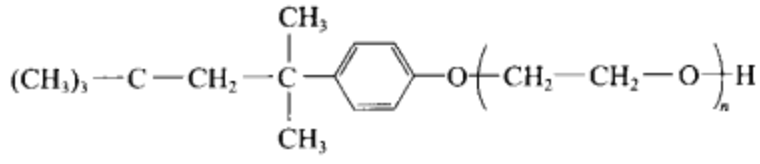
④ 细胞内的蛋白质浓度一般较高（400mg/ml 以上），蛋白质处于浓缩状态一般更加稳定。

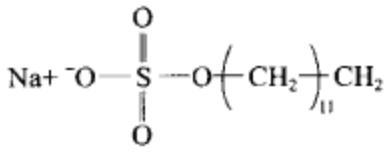
⑤ 细胞内发现有很多化学代谢物，可以特异性或非特异性地稳定蛋白质。

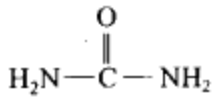
通过细胞匀浆释放胞内蛋白，会使上面许多条件逆转，因此，如果处理胞内蛋白，应特别注意最大程度地提高和保持蛋白质的稳定性。

3.6.1 化学失活

很多种类的化学物质可以使蛋白质失活，去垢剂如 Triton 和 SDS，离液剂如尿素和盐酸胍(图 3.31)，以及多种有机溶剂可以通过干扰稳定蛋白质天然结构的非共价键来导致蛋白质变性。去垢剂和有机溶剂作用于氢键，重金属可以促进蛋白质修饰从而使生物活性丧失。金属离子可以选择性地直接与氨基酸残基结合或促进其他物质与氨基酸残基的反应，例如多种重金属能够直接与半胱氨酸的巯基形成复合物，或者促进这些巯基基团发生由氧介导的氧化反应。







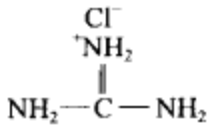


图 3.31 Triton、SDS、尿素和盐酸胍的分子结构

化学物质介导的蛋白质失活一般与浓度和接触时间有关，首先保证蛋白质溶液中不存在这些物质就可以很明显避免由此导致的蛋白质失活，然而，有时候这些物质是有意加入蛋白质中的（以实现包含体的溶解或溶剂介导的蛋白质沉淀），随后应除去这些物质。低温下（非常接近 0℃或 0℃以下）利用有机溶剂使蛋白质沉淀不会导致蛋白质变性，然而高温下蛋白质会发生折叠或呼吸，从而允许有机溶剂进入蛋白质结构内部，通过和疏水性氨基酸残基反应，有机溶剂破坏分子内的疏水作用，从而促进蛋白质变性。

去垢剂一般不会有意加入蛋白质溶液中（除非在特殊的环境下，如纯化高疏水性蛋白质），如果使用的纯化装置在预清洗步骤之后没有用水进行有效的清洗，去垢剂分子就会污染蛋白质。重金属也很少直接加入蛋白质溶液中（除非进行抑制实验）。然而，有时候重金属可以从处理设备流入到蛋白质溶液中，或者是加到蛋白质溶液中的化学物质（如缓冲液组分、盐等）的痕量污染物，因此用做这些目的的化学试剂应该是能够获得的最高纯度等级的试剂。

多种氨基酸的侧链都对由分子氧或多种其他的氧化剂（如过氧化物）介导的氧化作用敏感，甲硫氨酸和半胱氨酸侧链上的硫原子对氧化作用尤其敏感，金属离子可以加快这个过程。通常细胞内的蛋白质更易于通过氧化而失活，甲硫氨酸被氧化会产生一个硫氧化物或者

一种砜的衍生物（图 3.32），半胱氨酸的氧化将会导致二硫键的产生，但是在更强的氧化物质存在的条件下会产生磺基丙氨酸（图 3.32）。在一些情况下甲硫氨酸或半胱氨酸的氧化对蛋白质的生物活性没有什么影响，然而如果这个残基扮演一个中心的角色（结构上或功能上的），其氧化将会导致蛋白质活性的彻底丧失。蛋白质的氧化如果是一个难题，可以通过向蛋白质溶液中加入选择性的还原剂将其作用减到最小，最经常使用的还原剂包括二硫苏糖醇，β-巯基乙醇，维生素 C 和游离半胱氨酸等（图 3.33）。

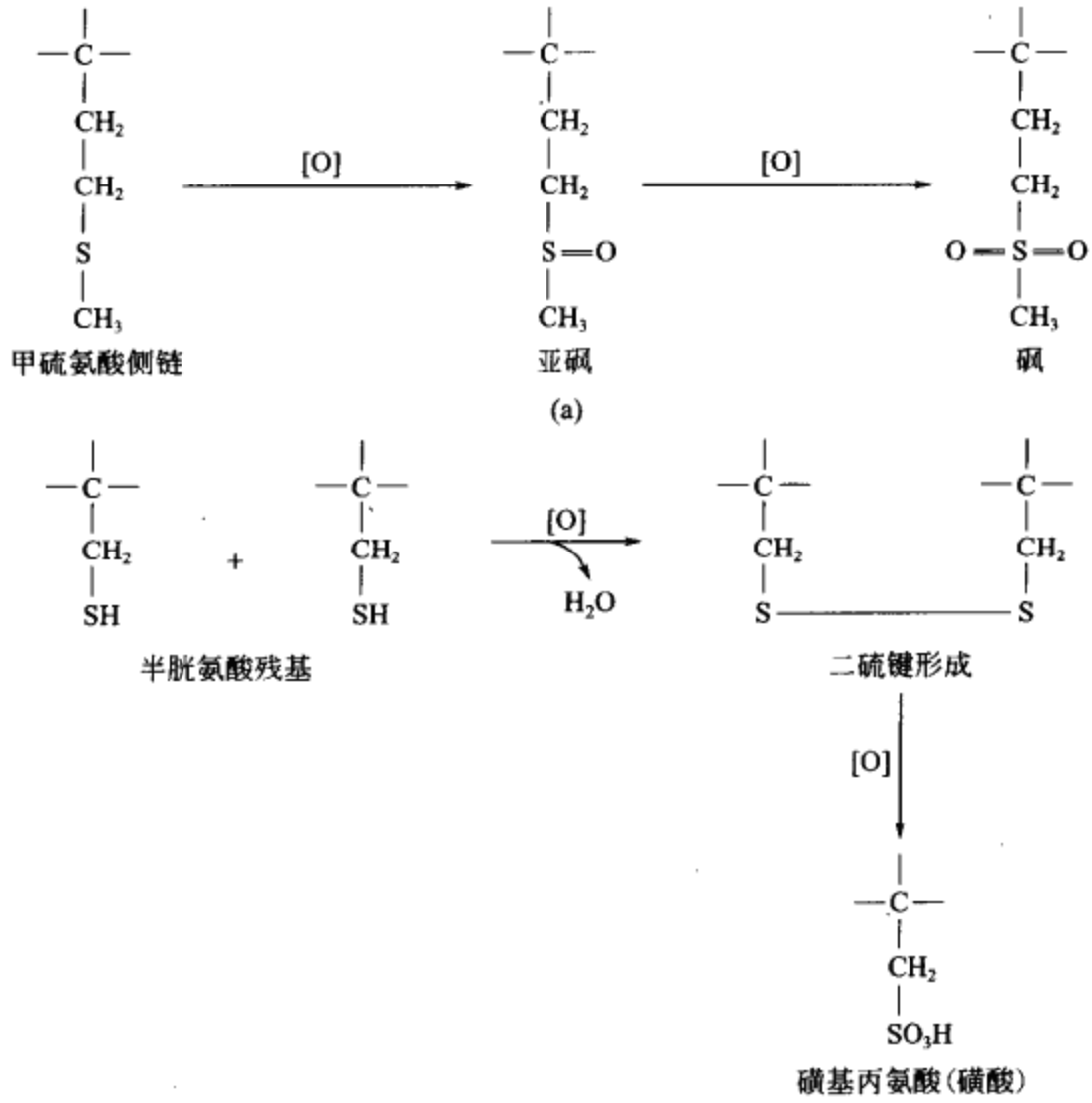


图 3.32　甲硫氨酸（a）和半胱氨酸（b）侧链的氧化

氧化作用可以通过暴露在空气中或更强的氧化剂（如过氧化物、超氧化物、羟基）中而发生，

细节查阅原文，经同意从 Walsh G (1998)，Biopharmaceuticals，Biochemistry and Biotechnology，John Wiley & Sons Ltd，Chichester，UK 复制

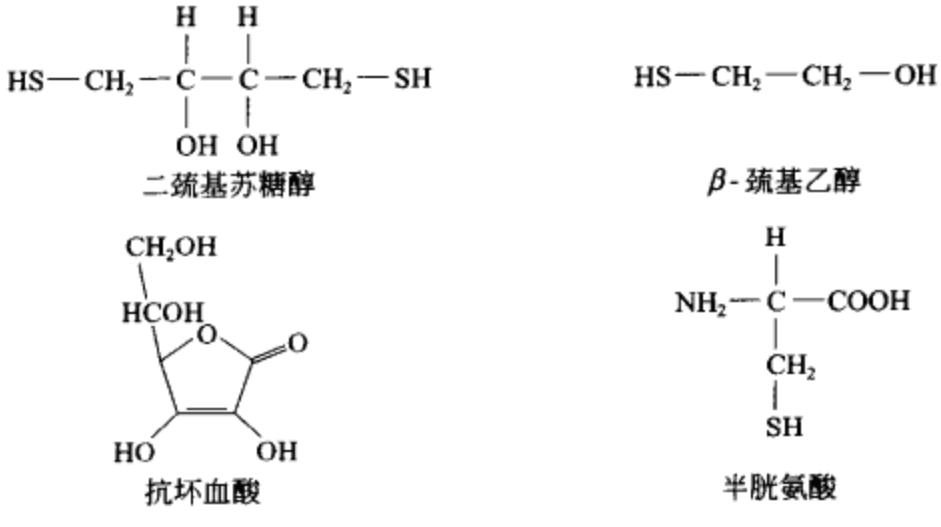


图 3.33　维持蛋白质还原状态常用的/可以使用的还原剂

3.6.2 生物或物理因素导致的失活

到目前为止，导致蛋白质失活的最重要的生物因素就是蛋白水解酶（蛋白酶，第 11 章），不同的蛋白酶对于它们要水解的特定的肽键表现出不同的特异性。如果敏感的肽键位于蛋白质表面，其水解作用更容易发生，这个过程经常会导致蛋白质失活（有些情况下部分水解影响不大，甚至对蛋白质活性有激活性的影响）。大多数对蛋白水解酶有抗性的蛋白质在变性后开始对其敏感（蛋白质伸展导致敏感性肽键暴露）。一般细胞内的酶类对于蛋白酶的降解作用可能最敏感。

尽可能快地进行蛋白质纯化的最初步骤可以使蛋白质水解降到最低（从而快速从目标蛋白中将蛋白酶分离出去），也可以通过保持低的处理温度（温度越低，蛋白水解酶的活性越低），或者在处理缓冲液中加入一种或多种蛋白酶抑制剂（见第 11 章）来实现。

糖酶和磷酸酶有时也会影响糖蛋白或磷酸蛋白的生物活性，尽管这个问题并不像蛋白水解酶导致的失活那么普遍，调节或去除糖蛋白中的糖成分可以影响其溶解性，有时会影响其生物活性（见第 1 章），大量的去糖基化如果使敏感肽键暴露，也可以潜在地导致蛋白质更容易水解。磷酸蛋白质的去磷酸化可以潜在地严重影响到其生物活性，这是因为磷酸化状态可以直接影响到这些蛋白质的活性。正如蛋白酶的情况一样，可以通过快速处理，保持低温和使用抑制剂将不需要的糖酶和磷酸酶的活性降到最低。

剧烈的搅拌是最普遍的一种导致蛋白质活性丧失的物理因素，搅拌经常会导致气相（通常为空气）进入蛋白质溶液中，气泡的存在能明显地大幅度提高整个液-气接触面积，蛋白质倾向于沿着这样的接触面排列，而这个过程经常会导致其部分或完全的变性（见第 13 章）。搅动通常是细胞破碎的一个要素，但是实际上在蛋白质纯化的过程中也会有搅动（如沉淀过程中剧烈搅动或大规模蛋白质纯化方案里的机械泵操作）。

极端的温度和 pH 也可以导致蛋白质失活，它们一般通过促进蛋白质变性来达到这一目的。“极端”一词是相对于通常能使蛋白质最稳定或接近最稳定的“正常”条件而言。例如，80℃对于动物蛋白而言是极端的，但是却非常接近大多数超嗜热性蛋白质的最佳操作温度（见第 1 章和第 10 章）。极端的 pH 能够促进蛋白质的解折叠，这将会影响到侧链上的（可离子化）氨基酸残基的离子化状态，从而顺次影响到离子吸引力和排斥力的范围和分布，而离子间的吸引力和排斥力对大多数蛋白质天然结构的稳定具有重要的作用。在蛋白质的提取、纯化和储存的全部过程中将其置于合适的缓冲液中可以避免蛋白质暴露在极端的 pH 中，用于这个目的的缓冲液列于表 3.12 中。极端的 pH 也可以通过促进共价修饰来诱导蛋白质的不稳定，如 Asn 和 Gln 残基的氨基在极端 pH（和高温下）易于发生变化，在这样的条件下经常会脱去酰氨基（图 3.34）。

高的温度可能通过干扰稳定蛋白质结构的非共价键促进蛋白质的去折叠，将蛋白质溶液放在冰上等方法可以使温度保持较低的水平。尽管蛋白质溶液处于低温时有利于稳定，但是低温操作会延缓纯化过程（例如，如果蛋白质处于黏稠的缓冲液中，低温会降低通过层析柱时的流速），这将是有害的，例如，会延长蛋白质暴露在任何所存在的潜在变性因素中的时间。

冷冻和随后的解冻对于大多数蛋白质是无害的，但仍会使一些蛋白质失活，失活一般与蛋白质溶液中确切的溶剂组分有关，就像后面所描述的，冷冻能有效地浓缩水溶液中所有的溶剂组分，如果任何“污染的”溶剂为潜在的变性剂，这种浓缩作用将会导致蛋白质失活。

表 3.12　维持蛋白质溶液预定 pH 值常用的缓冲液①

缓　冲　液	有效 pH 范围
Clark 和 Lubs	1.0～2.2
甘氨酸-盐酸	2.2～3.6
柠檬酸-柠檬酸钠	3.0～6.2
乙酸钠-乙酸	3.7～5.6
Tris-Maleate②-NaOH	5.4～8.4
Na_2HPO_4-NaH_2PO_4	5.8～8.0
Tris-HCl	7.1～8.9
HEPES-NaOH	7.2～8.2
甘氨酸-氢氧化钠	8.6～10.6
碳酸盐	9.7～10.9
氢氧化物-氯化物	12.0～13.0

① 缓冲液就是加入少量酸或碱不改变其 pH 值的溶液，有弱酸（H^+ 供体）及其共轭碱（H^+ 受体）构成。正如下面指出的一样，任何缓冲液都只能在特定的 pH 范围内保持其缓冲力，精确的缓冲液组成参见 Data for Biochemical Research，Oxford Science Publications，1986。

② 表示马来酸。

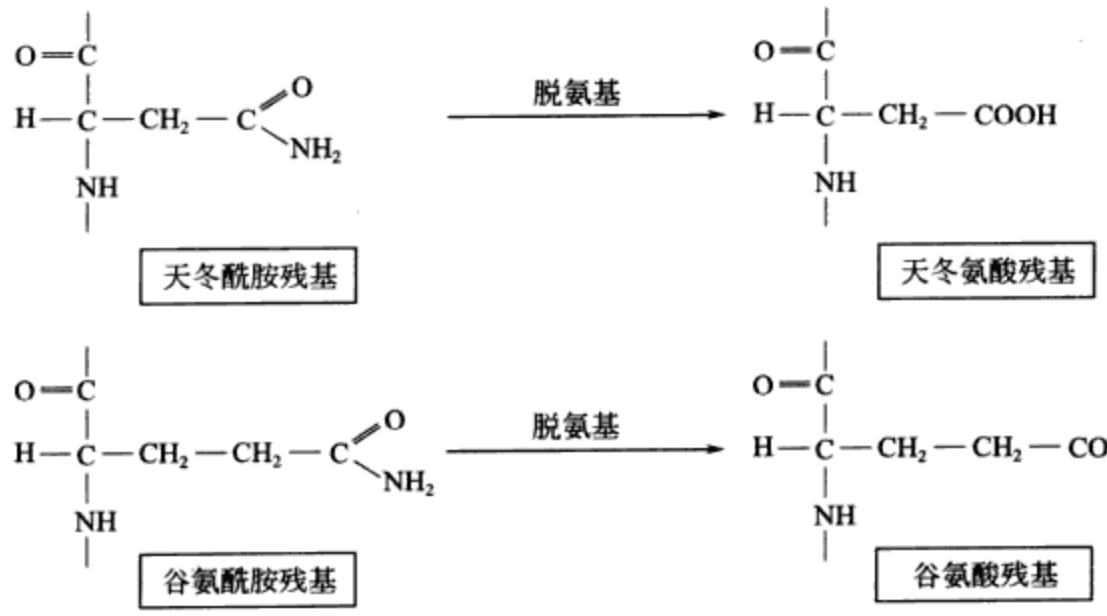


图 3.34　天冬氨酸和谷氨酸残基去酰胺化——分别产生天冬氨酸和谷氨酸

从 Walsh G（1998），Biopharmaceuticals，Biochemistry and Biotechnology.（John Wiley & Sons，Ltd，Chichester，UK）复制

另外，由于冷冻过程中温度持续降低，一些溶剂组分将会选择性地从溶液中结晶析出，这可能是有害的，例如，一种缓冲液组分优先结晶，将会使包含有蛋白质的剩余未结晶溶液的 pH 值大幅度浮动。

3.6.3　稳定蛋白质的方法

有些蛋白质在提取、纯化或者储存过程中不需要采取特别的稳定步骤，然而，为了最大程度地保证蛋白质的稳定，可以采用许多常规的步骤，这一般包括：

① 保证蛋白质一直处于 pH 值能保证其最高稳定性的缓冲液中；

② 保证提取和处理温度是可控制的，由此蛋白质不会暴露在高的温度下；

③ 尽可能缩短处理时间，以确保蛋白质与任何变性因素的接触时间降到最低；

④ 避免诸如剧烈搅拌或加入已知的可促进目标蛋白变性的化学物质等操作；

⑤ 所有的处理缓冲液中包含能够中和或失活目标蛋白灭活剂的物质（如对于蛋白酶敏感的蛋白质加入蛋白酶抑制剂，对于氧敏感的蛋白质加入还原剂）；

⑥ 所有的提取和处理缓冲液中包含目标蛋白（如果已知）的稳定剂。

蛋白质稳定剂可以分为两种类型：特异性的和常规的。顾名思义，特异性的稳定剂通过和靶蛋白发生生物特异反应而发挥作用，例如它包括许多酶的底物（或竞争性抑制剂），一些情况下抗体也可以特异性地结合到目标蛋白上。常规的稳定剂以非生物特异性的方式发挥作用，它包括甘油、多种糖酶、聚合物（如聚乙烯乙二醇）、氨基酸（如 Gly）和大分子蛋白质（如牛血清白蛋白，bovine serum albumin，BSA）。

诸如甘油、糖和聚乙二醇等物质经常用作常规的稳定剂，尤其是用于来源于细胞内的蛋白质。这些物质可能通过降低水的活性来实现它们预期的作用。大多数完整细胞内的水不能自由流动，而是或紧密或松散地与蛋白质或其他细胞分子结合在一起（即“自由水”活性低），匀浆细胞（每单位质量的细胞经常使用数倍体积的缓冲液）使细胞内的蛋白质释放到一种稀释溶液中，从而自由水的水平表现出大幅度提高。甘油、糖和多种聚合物通过和大多数的水以氢键连接，能够降低自由水的水平，这是非常接近于正常细胞内条件的模拟状态，处于这种条件下的蛋白质通常更为稳定。

多种氨基酸也可以用来稳定一些溶液中的蛋白质，最经常使用的是 Gly，甚至发现 Ala、Lys、Thr 也有这方面的作用。氨基酸稳定蛋白质的分子机制还没有完全了解，直接和一些蛋白质相互作用也许是其中的一个因素，但是通过降低容器内壁的吸附也许也可以有效地稳定蛋白质。

有些蛋白质即便在高浓度下是稳定的，在稀释后开始变得非常不稳定。在溶液中加入大分子蛋白质如 BSA 也许会使稀释的蛋白质稳定下来，稳定的机制可能是通过直接和蛋白质相互作用，也可能是通过提供任何存在的灭活剂的替代性靶标，以及通过降低容器表面对目标蛋白的吸附作用。加入的任何稳定剂必须对蛋白质随后的纯化步骤没有干扰。

一旦纯化到一个可接受的水平，大多数的蛋白质在用于其预期的理论或应用研究目的之前都会储存一段时期，蛋白质在储存时其稳定性变化是非常大的，它依赖于：a. 蛋白质本身的稳定性；b. 所选择的储存条件，储存条件的优化永远是一个不断实验和犯错误的过程，但是一般会考虑到以下几点：

① 蛋白质必须储存在能保持其最大稳定性的温度和 pH 值条件下，许多蛋白质在室温下就可以保存数月，其他蛋白质只有储存在 4℃或冷冻条件下才是稳定的。

② 如果以液体的形式进行保存，必须考虑加入稳定剂（如前所述），储存前蛋白质溶液过滤除菌和加入防腐剂也应该较为理想。

③ 如果冷冻保存，蛋白质溶液应该快速冷冻，随后保存在－20℃，或者置于－70℃更好。

④ 蛋白质如果以干粉形式保存会更稳定。

3.6.4 冷冻干燥

冷冻干燥法（简称“冻干”）是直接从冷冻状态得到蛋白质干粉（或其他材料），这需要首先在一个合适的、未加塞子的容器中冷冻蛋白质溶液，然后抽真空和升高温度以促进冰的升华，冰的升华在压力降低时会发生，它直接以水蒸气的形式析出，容器在冻干过程结束后

可以密封。许多冻干的蛋白质可以在室温下长时期保存，而生物活性很少或不发生丧失，然而一些冻干蛋白质如果储存在这样的条件下将会表现出活性的严重丧失，因此它们必须在低温下保存。冻干技术的优缺点列于表3.13。

表3.13　冻干蛋白质的优缺点

优　点	缺　点
冻干是最温和的干燥蛋白质的方法	工业规模的冻干设备非常昂贵
冻干产物很轻，因而降低了运输和分发成本	运行费用高
冻干蛋白质使用前可以迅速重构（再水合）	冻干处理周期长（典型的是3～5d）
管理当局认可冻干作为注射用终产品保存技术	冻干有时会使一些蛋白质的生物活性不可逆地降低

注：一些要点与工业阶段操作背景的关联更密切。

很多商品化的蛋白质，尤其是一些价值高、体积小的产品如疫苗、治疗用酶类、激素、抗体和诊断试剂等，经常以冻干粉剂的形式进入市场。这项技术在实验室研究阶段也是常规技术，冻干蛋白质的平均湿度约为3%，但是蛋白质产品中经常有一些区域的湿度更高，导致产品不均一。

冻干的第一步是直接将蛋白质溶液装在一个合适的容器中进行冷冻，一般为玻璃瓶或细颈瓶。随着温度降低会形成冰晶，这种晶体仅包含纯的水分子，随着冰晶的增加，蛋白质的浓度和留在液相中的所有其他溶剂的浓度都会稳步增加，任何溶质如盐、缓冲液组分、其他的化学添加剂或产品中的蛋白酶都会浓缩很多倍。溶质的浓度越大，它们之间的反应速度越高，高浓度的这些溶质成分会损伤蛋白质并由此可能使其失活，这种失活可能是由于蛋白质的化学或生物学修饰导致的，也可能是由于蛋白质聚合引起的。

继续冷冻，一些浓缩溶液中的溶质也可能发生结晶从而离开溶液，由于温度仍然继续降低，未冻结的溶液的黏度急剧上升，开始变为越来越像橡胶样的形状，最后，未冻结溶液会从橡胶样的连续结构变为玻璃样，发生这种转变的温度被称为玻璃转变温度（transition temperature，T_g）。这种玻璃包含所有未结晶的溶质分子，包括蛋白质和所有未结晶水分子，这些水分子与溶质分子结合在一起。从结构上来说，这种玻璃并不是固体而是一种液体，这种液体的流速非常低，只有每年约几毫米。任何材料的玻璃包括窗玻璃或镜玻璃在这一点上是一样的。然而从机械上来说这种玻璃也许可以认为是固体。在含有50%以上水的这种玻璃中，实际上不存在任何溶质分子的迁移，化学迁移和由此产生的反应性在玻璃相中全部停止了，因此，为了将蛋白质失活程度降到最低，从冰晶最初形成开始，应该尽可能快地将温度降到玻璃转化温度以下。

任何特定溶液的 T_g 值依赖于它的组成，可以通过差示扫描量热法实验测定。测定过程包括加热玻璃样产品，随后用温度对特定热量值绘图，在玻璃转换温度处会发现有一个热量值的急剧升高。蛋白质溶液 T_g 值的确定有利于制定更加合理的制备特定蛋白质的冻干方案。

在冻干过程中当温度降到玻璃转换温度以下时开始使用真空泵，对于大多数蛋白质溶液来说，需要将温度降到－40℃至－60℃之间，之后可以升高温度促进结晶水的升华，这需要能量的输入，在大多数工业冻干系统中，这仅需要提高支架的温度即可实现，随后需要进行温度控制以确保初步的冻干过程保持最大的效率，支架的温度一般都要维持在0℃以上以促进有效的升华，而瓶内的温度将依然处于0℃以下。如果在初步冻干过程中温度维持在 T_g 值以下，结晶水移走以后将会留下一块像蛋糕一样的蛋白质；然而，如果产品温度升高到 T_g 值以上，这可能发生在支架温度过高的时候，当结晶水升华时留下的黏稠溶液能流动，

这将导致形成一个稠密的而非松散的块状结构，处于其中的蛋白质可能会失活，并且重新水化的速度非常慢。从根本上来说，任何一种溶液的玻璃转换温度依赖于其组分，在冻干过程中 T_g 值不断变化，在水蒸气从产品中移走时是升高的。

初步干燥完成以后，蛋白质块仍然有一定的湿度，未结晶的水分子与玻璃结合在一起，在第二步干燥过程中瓶内的温度仍然继续上升，从而通过升华除去水分子。第二步干燥完成以后，真空泵停止使用，瓶子被密封。

尽管现在有许多不同的冻干模型，但是所有这些都包括一些必需的部件，都有一个在其中放置以及随后冷冻产品的干燥室，就基本的实验室规模的系统而言，通常包括一个圆底的细颈瓶，可以通过一个合适的端口连接到冻干仪上，真空泵是必需的，以对干燥室抽真空并在干燥过程中保持真空状态，合适的冷凝器也是需要的，干燥过程中从产品里散发出的水蒸气收集在冷凝室中，由于内部的温度低（一般为－50℃到－60℃），水以冰的形式凝集，在干燥循环完成以后，冷凝室的温度上升导致冰融化，在下一个循环开始之前室内的水被排干。

工业规模的冻干仪通常每个干燥循环处理数千个产品瓶，装入产品以后，每个瓶口塞上橡皮塞但留有一定空隙，以保证在干燥过程中允许水蒸气自由的流出瓶子。这些瓶子放在干燥室内支架上的一系列托盘上，每个支架都可以用电加热或冷却，瓶子放好以后，干燥室的门关闭，支架的温度降低到－40℃到－60℃以冷冻产品，许多探测器插入实验瓶中以精确监测实际的产品温度。

达到预定的温度之后，这个温度应该低于产品的玻璃转换温度，干燥室开始抽真空，抽真空时支架的温度应该适度地升高以提高第一步和第二步干燥的效率。冻干循环完成以后，除去真空泵，瓶子在原位密封。现代化冻干系统中设计的支架可以利用水压使单个支架向上或向下移动，当任何一个特定的支架向上移动时，由于瓶子和突然上移的支架相接触，部分插入的橡胶塞子就会完全插入瓶子。在现代化冻干系统中所有可变化的参数，如温度、降压水平都可以在中央控制台预先设置好，因此冻干循环可以是全自动的，在冻干过程中连续监测和记录单个支架温度、产品温度以及真空水平等参数。大多数冻干系统也允许干燥室原位加热灭菌，这也极大地便利了随后冻干蛋白质的使用，因为有些蛋白质必须在无菌的条件下进行处理。

3.6.5 蛋白质的微量纯化

蛋白质纯化等级依赖于需要纯化的产品数量（表 3.1），本章介绍的一系列常规纯化手段都是纯化 mg 级以上的纯蛋白时所使用的方法，更少量的蛋白（ng～μg 水平）有时候可选择其他的一些方法进行纯化，对于以前未进行过性质研究的蛋白质而言，这样少量的产品对于进行部分的序列分析和质谱分析通常来说是足够的。可以利用获得的信息，如分离出编码蛋白质的基因，以进行大规模的重组蛋白的生产。微量纯化通常可以利用分析级的装置（如双向电泳、毛细管电泳或分析 HPLC 柱）简单分离粗制蛋白。

3.7 蛋白质的鉴定

一旦纯化完毕，大多数的蛋白质就要进行一连串的特性研究，表 3.14 总结了其中最重要的一些研究。研究的确切内容将主要依赖于纯化蛋白质的最终目的，为了学术研究而纯化

表 3.14　全面鉴定蛋白质特性可能进行的主要研究及所使用的分析技术

特 性 研 究	使用的方法/技术
功能描述	依赖于蛋白质的生物活性，实例包括特定活性的确定，温度、pH 值等对生物活性的影响，配基相互作用研究等
纯度证明	SDS-PAGE，双向电泳、等电聚焦、HPLC 分析、质谱和毛细管电泳
结构研究	
确定分子量	SDS-PAGE，非变性电泳(Ferguson plots)、凝胶过滤、分析超离心和质谱
一级结构分析	氨基酸组成、肽图谱、N 末端序列分析和全部的氨基酸序列测定
二级/三级/四级结构分析	圆二色性、荧光光谱、核磁共振、X 射线结晶学和分析超离心
翻译后修饰分析	种类繁多，依赖于确切的修饰方式

的蛋白质通常要进行广泛的特性研究，尤其是如果该蛋白质以前未研究过；就商业目的生产的蛋白质而言，其纯化水平和特性鉴定依据预先设定的用途而变化（见第 4 章），治疗用途的蛋白质要进行最为广泛的特性研究。

重组蛋白的特性描述与非重组蛋白所使用的技术和程序是一样的，然而依所采用的表达系统和纯化步骤的不同，一些特性研究具有特别的意义：

① 以包含体形式表达的蛋白质，需要变性和重折叠的步骤，这种情况下需要进行构象研究；

② 以融合形式表达的蛋白质，其标签在纯化过程中去除，需要进行 N 末端或 C 末端序列分析；

③ 在天然状态下为糖基化的蛋白质需要进行翻译后修饰分析。

可以单独对靶蛋白进行特性研究，也可以出于对比目的，同时对纯化蛋白和标准蛋白进行研究，例如，纯化的重组蛋白有些时候与直接从天然材料中提取和纯化的蛋白质同时进行性质研究，用这种方式可以直接将重组蛋白和天然蛋白进行比较。如果编码目标蛋白的基因序列已知，性质研究只需要简单地证实是否为蛋白质本身，以及鉴定是否存在任何的翻译后修饰。

经常使用的主要的特性研究总结如下，这些技术背后的理论并没有详述，因为其广泛的覆盖面已经超出了本书的范围。另外需要注意的是一些通常用于蛋白质结构性质研究的技术已经在第 1 章中描述过，读者可以在那儿进行查阅。

3.7.1　功能研究

顾名思义，功能研究目的在于研究纯化蛋白质的生物功能和活性，及其活性如何受多种相关因素影响。研究的类型和范围主要依赖蛋白类型和预期用途。对于酶来说，基本的功能研究通常包括：

① 特定活性的确定（每毫克蛋白的活性单位数）；

② 底物范围和特异性的确定；

③ 动力学特征（如 K_m，V_{max}和 K_{cat}值的确定）；

④ 多种因素对酶活性的影响（如温度、pH、抑制剂）。

如果酶是用于特定的应用目的，将会详细地进行基于此目的的具有特殊意义的功能研究（如温度活性曲线以及用于高温工业加工的酶的热稳定性）。

3.7.2 纯度证明

纯度指的是在最终的纯化蛋白质中不含有污染物，对于不同的人来说污染物代表的可以是不同的东西，而污染物概况的研究通常依赖于纯化蛋白质的最终目的。对于那些纯化后用来在学术上进行性质研究的蛋白质而言，关注的污染物（即试图证明纯化的蛋白质中不含的污染物）主要是一些蛋白质，蛋白质污染物可以与目标蛋白毫无关系或是目标蛋白的修饰或部分降解产物。纯化后用于治疗用途的蛋白质，其污染物名单非常长，不仅包括那些修饰蛋白，也包括热源、核酸、微生物和病毒颗粒（详见第 4 章）。本章中所讨论的有关于纯度的证据将限于确定污染蛋白质的存在与否上，有一点需要记住的是，任何污染类型的探测在本质上受限于所使用探测技术的灵敏度。

用于测定蛋白质纯度的最普遍的方法是在阴离子去垢剂 SDS 存在的条件下进行单向聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE，如图 3.31）。任何带电荷的物质，包括蛋白质都会在电场中迁移，迁移率依赖于蛋白质的荷质比（即电荷密度），PAGE 中迁移发生在聚丙烯酰胺凝胶中，凝胶的平均孔径很大程度上依赖于聚丙烯酰胺的浓度，因而 PAGE 中会发生分离筛选效应，蛋白质的迁移率受其大小、形状和电荷密度所影响。

蛋白质与 SDS 一起孵育有两个显著的影响：①SDS 使大多数蛋白质变性，使它们形状近似相同；②以大约 1 个 SDS 分子相对于两个氨基酸残基的恒定比率直接与蛋白质结合，实际上这就赋予了所有蛋白质以同样的（负的）电荷密度，由此用 SDS-PAGE 分离蛋白质就会产生筛选效应，蛋白质越小，向正极迁移的速度越快（图 3.35）。SDS-PAGE 可被用作两个目的：①确定蛋白质纯度；②确定蛋白质亚基分子量。如果蛋白质只有一条多肽链（或者蛋白质包含多个相同的多肽链），凝胶中只有一条带，由此来显示纯度，如果纯化的蛋白质含有两个或更多不同的多肽亚基（如抗体），在 SDS 凝胶中会产生两条或多条带，蛋白条带可以利用蛋白结合染料如考马斯亮蓝或银染料（灵敏度比考马斯亮蓝高 10～100 倍）进行染色。

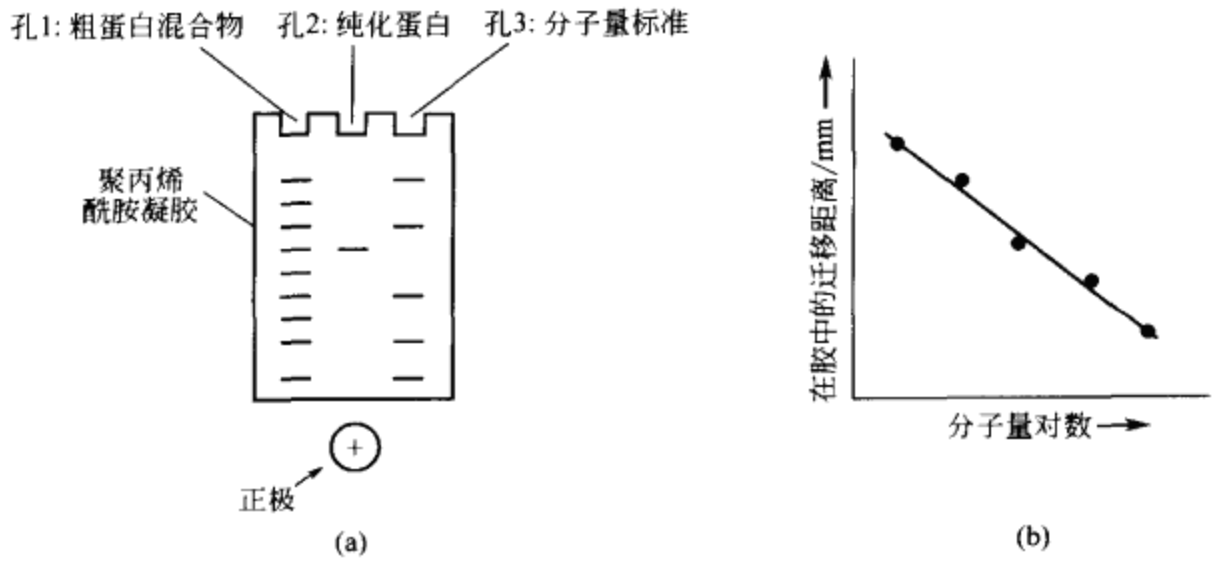


图 3.35 SDS-PAGE 分离蛋白质

(a) 蛋白质样品与 SDS（以及破坏二硫键的还原剂）一起孵育，要分析的蛋白质样品上样于凝胶孔后，在凝胶上施加电场，蛋白质向正极的迁移率依赖于其大小。电泳完成以后，利用蛋白质结合染料对单个蛋白质条带进行染色。(b) 如果一个凝胶孔中加入的是已知分子量的蛋白质混合物，就会建立一条迁移距离相对于分子量的标准曲线，这就可以判定纯化蛋白质的分子量

蛋白质的单向 PAGE 可以在非变性的条件下进行，纯蛋白也通常会产生单一条带，用考马斯亮蓝染色可见。由于蛋白质保持了其天然构象，可以通过使用一些类型的活性染料或用荧光标记抗体来证实其同一性。

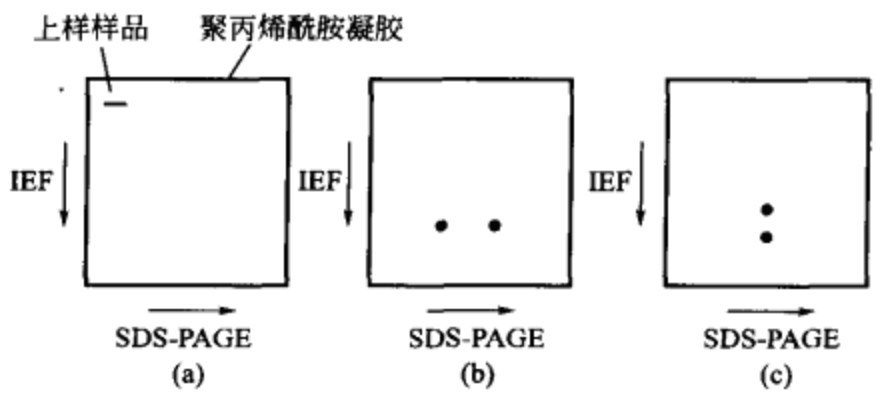


图 3.36　双向电泳原理

(a) 蛋白质上样于聚丙烯酰胺凝胶后先进行等电聚集(IEF)，这一步完成以后蛋白质条带在垂直的方向上进行 SDS-PAGE；(b) 两种技术联合使用比单用任何一种技术都具有更高的分辨力，等电点相同而分子量不同的两种蛋白质的分析情况；(c) 分子量相同而等电点不同的两种蛋白质的分析情况

等电聚焦是另外一种分析（或有时候微量纯化）蛋白质的电泳形式，这种技术也包括聚丙烯酰胺凝胶电泳，但是凝胶中存在低分子量的有机酸和碱的混合物（两性电解质），在电场的影响下，两性电解质在凝胶中分布从而形成 pH 梯度。要分析的蛋白质溶液通常首先与尿素一起孵育，蛋白质变性会暴露全部的氨基酸侧链，这有助于确定蛋白质的等电点（pI）。

蛋白质上样后将持续在凝胶中迁移，直到它们到达凝胶中 pH 值与其等电点相等处为止（蛋白质在其等电点处所带净电荷为零，因而不会在电场的影响下移动），一种商品化的混合物作为蛋白质标准（已知 pI）同时进行电泳，这将有助于产生一个标准曲线从而将迁移距离和 pI 值等同起来，因此，纯化蛋白的 pI 值也可以确定。

评定蛋白质纯度的一个更有说服力的方法是将 SDS-PAGE 和等电聚焦联合使用，也就是双向电泳分析（图 3.36），除了纯度分析之外这项技术还可以用于分析复杂的蛋白质溶液。每种分离方式可以单独分辨约 100 个蛋白质条带，但是两种方法联合起来可以确定 1000～2000 个蛋白质条带。

毛细管电泳是另外一种电泳形式，基于电荷密度来分离分子，然而在这种情况下，电泳分离不是发生在聚丙烯酰胺凝胶中，而是在用熔融硅胶基质包被而成的孔径非常窄的毛细管中进行（图 3.37）。尽管大多数情况下是用来分析低分子量物质（药品、代谢物和肽），毛细管电泳也可以用于蛋白质分析。蛋白质纯度也经常用 HPLC 来检测，作为一种技术，HPLC 被认为具有最高的解析率和非常快的分离速度。检测敏感蛋白质时在线探测器可以进行快速灵敏的分析，在评定纯度时，蛋白质样品可以利用至少两种不同的 HPLC 柱子，多数情况下为反相柱和离子交换柱。

质谱也可以用来检测纯度，尽管其主要用途为确定分子量，这将在下一部分详述。

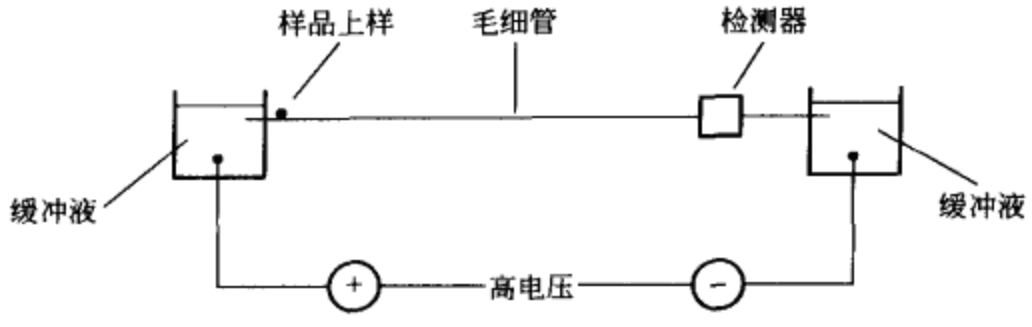


图 3.37　毛细管电泳图解

上样后使用高电压，在随之产生的电场的影响下蛋白质开始迁移，利用在线紫外探测器可检测到蛋白质，毛细管一般长 30～60cm，为了便利经常缠绕起来，其内径在 50μm 以下

3.7.3 分子量的测定——质谱

最近的（和最灵敏的）确定蛋白质分子量的技术就是质谱（mass spectrometry，MS），这项技术的基本原理见图 3.38，质谱作为识别和鉴定小分子的分子量的核心技术已经发展了很多年，只是近期才常规应用于蛋白质工作，这可能是由于合适的离子化技术的发展，从而能够产生气相电离蛋白质，质谱仪越来越容易操作。

图 3.38 质谱进行蛋白质分析的基本原理

系统由 3 个必需的部分组成：离子源用来产生气相离子化蛋白质，分析管内发生离子化蛋白质的分离（基于分子量进行），检测器用以显示蛋白质离子已到达管末端，产生的数据转移到合适的记录系统中。操作细节参见正文

现在已经涌现出的产生气相电离蛋白质分子的两种方法是：电喷雾电离（electrospray ionization，ESI）和基质辅助激光解吸附电离（matrix-assisted laser desorption and ionization，MALDI）。就 ESI 而言，蛋白质溶液通过一个孔径非常窄的处于高压下的针，随着溶剂的快速蒸发，就会产生一种含有荷电蛋白质分子的雾滴，处于气相中的带电蛋白质直接流入质量分析管中。这种电离过程发生在大气压下，因此基于 ESI 的系统可以直接与层析技术如 HPLC 联用。

MALDI 已经成为确定蛋白质分子量的首选方法，首先将蛋白质样品与一个物质的量过量的基质化合物混合，这种基质化合物是低分子量的有机酸，可以高度吸收紫外光，如芥子酸和 2,5-二羟基苯甲酸，混合物干燥后用激光轰击产生紫外光子，基质分子吸收紫外光导致基质-蛋白质晶格的快速分解，将基质和蛋白质都送入气相。光子从活化的基质分子转移到蛋白质分子中导致后者电离，离子化的蛋白质在强大电场的影响下从电离位点向分析管处加速，质量分析仪根据荷质比（m/z）分离离子。

飞行时间（TOF）分析仪，顾名思义，测量的是离子到达位于分析管末端的探测仪所需要的时间，它经常与 MALDI 联合使用（MALDI-TOF），分析由 MALDI 产生的蛋白质离子，当进入分析管时，所有的蛋白质离子必须都具有同样的动能和电荷，因为每个蛋白质离子到达探测仪所需要的时间将会反映出其分子量大小，蛋白质分子量越小，其行进速度越快。MALDI-TOF 系统在高度真空条件下进行操作。

质谱能够精确地判断约 500ku 以上的蛋白质的分子质量，精确度在 0.01%以内（用 SDS-PAGE 判断蛋白质分子质量仅能精确到 5%～10%），分析所需要的样品量仅为几个皮摩尔，进一步将实际测得的分子量与该蛋白质的理论分子量（从基因或 cDNA 序列推算得到）进行比较，可以揭示是否存在蛋白质修饰或翻译后加工，例如，如果实测值比理论值高 80u，就说明可能存在磷酸或硫酸基团。

除了质量分析，质谱还可以用来产生序列数据，因此这项技术是对 Edman 降解分析（第 1 章中讨论）的补充。序列分析需要使用前后两个质谱仪（MS/MS），包括两个质量分析管顺序相连，中间只通过一个碰撞室相间隔。需要进行序列分析的蛋白质首先在化学试剂或酶的作用下断裂成片段（见第 1 章），片段首先在第一个分析管中分离，每次选择出一个离子化肽段进入碰撞室，与充入其中的气体分子（He 或者 Ar）发生碰撞，这将促进其进一步断裂成一定范围内的辅助性肽段，这些肽段将在第二个分析管中根据质量进行分离。

在第二个分析管中利用计算机对每个片段进行质量分析，由此就会产生近乎完全的或完全的序列数据，质谱的解读是一项复杂的需要计算机去完成的任务，但是质谱/质谱展现出一些潜在的优势：

① 它可以提供封闭的或经过修饰的肽的序列信息；

② 比 Edman 降解法快速；

③ 和 Edman 降解法一样灵敏。

确定蛋白质分子量的其他方法包括凝胶过滤分析、非变性电泳和分析超速离心法。就像前面概述的一样，凝胶过滤根据蛋白质的大小和形状进行分离，由于多数球蛋白的形状都是大致的球形，它们将主要依据分子量进行分离。利用凝胶过滤进行质量分析需要使用一系列的蛋白质标准（即已知分子量的球状蛋白质，表 3.15）对凝胶过滤柱进行标定，用分子量的对数相对于洗脱体积作图，会得到一种线性关系，由此就会产生一条标准曲线，从而将洗脱体积和未知蛋白质的分子量对应起来。

表 3.15　用凝胶过滤柱确定球蛋白分子质量经常使用的分子质量标识物

蛋白质标准	分子质量/ku
马心细胞色素 c	12.4
牛红细胞碳酸酐酶	29.0
牛血清白蛋白	66.0
酵母乙醇脱氢酶	150.0
马铃薯 β-淀粉酶	200.0
马脾去铁铁蛋白	443.0
牛甲状腺球蛋白	669.0

非变性 PAGE 根据大小、形状和电荷数目分离蛋白质，非变性系统可以产生 Ferguson 图，从而用以确定蛋白质的分子量。对于任何用 PAGE 分离的蛋白质而言，其在凝胶中的相对迁移率（R_f）随着丙烯酰胺浓度的上升而下降。而对于某一特定的蛋白质，通过在一些不同浓度的凝胶中进行电泳，就会得到一条 R_f 相对与丙烯酰胺浓度的曲线图（Ferguson 图），图中可见一条直线，其斜率就是 K_r（阻滞系数），蛋白质的分子量越大，其 K_r 值越大。通过确定一些分子量已知的蛋白质的 K_r 值，就会得到一条 K_r 值相对于分子量的标准曲线，确定了未知分子量蛋白质的 K_r 值以后，利用标准曲线就可以得到其分子量。

分析超速离心法也可以用来确定蛋白质的分子量，这必须赋予蛋白质非常高的离心力（转头速度高于 60000r/min），同时要监测蛋白质在离心管中的迁移率，这通过使用特殊设计的样品管来实现，通过这些数据可以确定蛋白质的沉降系数，进而通过 Svedberg 等式可以算出蛋白质分子量。

3.8　进一步的阅读材料

图书

Crabb, J. (1994) *Techniques in Protein Chemistry*. Academic Press, London.

Harris, E. (2000) *Protein Purification Applications*. Oxford University Press, Oxford.

Harris, E. (2001) *Protein Purification Techniques*. Oxford University Press, Oxford.

Matejtschuk, P. (1997) *Affinity Separations*. IRL Press, Oxford

Oliver, R. (1998) *HPLC of Macromolecules*. IRL Press, Oxford

Sadana, A. (1997) *Bioseperations of Proteins*. Academic Press, London.

Scopes, R. (1993) *Protein Purification*. Springer Verlag, Godalning.

论文

蛋白质纯化

Afeyan, S. P. *et al*. (1990) Perfusion chromatography, an approach to purifying biomolecules. *Bio/Technology* **8**, 203－206.

Charcosset, C. (1998) Purification of proteins by membrane chromatography. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **71**, 95－110.

Chase, H. (1994) Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends Biotechnol.* **12**, 296－303.

Dyr, J. & Suttnar, J. (1997) Separation used for purification of recombinant proteins. *J. Chromatogr. B* **699**, 383－401.

Geisow, M. J. (1991) Stabilizing protein products: coming in from the cold. *Trends Biotechnol.* **9**, 149－150.

Hjorth, R. (1997) Expanded bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments. *Trends Biotechnol.* **15**, 230－235.

Huddleston, J. *et al*. (1991) The molecular basis of partitioning in aqueous twophase systems. *Trends Biotechnol.* **9**, 381－388.

Knight, P. (1990) Bioseparations: Media and modes. *Bio/Technology* **8**, 200－201.

Muller, C. J., (1990) Separation of proteins and nucleic acids using "tentacle type" ion exchangers. *Mod. Methods Protein Nucl. Acid Res.* 99－115.

Muller, W. (1990) New ion exchangers for the chromatography of biopolymers. *J. Chromatogr.* **510**, 133－140.

Narayanan, S. (1994) Preparative affinity chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A* **658**, 237－258.

O'Carra, P. & Barry, S. (1972) Affinity chromatography of lactate dehydrogenase. *FEBS Lett.* **21**, 281－285.

Ohlson, S. *et al*. (1989) High performance liquid affinity chromatography: a new tool in biotechnology. *Trends Biotechnol.* **7**, 179－185.

Pilak, M. J. (1991) Freeze drying of proteins, part Ⅰ: process design. *Pharm. Technol. Int.* **3**, 37－43 [originally printed in *BioPharm*, 1980, **3** (8), 18－27].

Pilak, M. J. (1991) Freeze drying of proteins, part Ⅱ: formulation selection. *Pharm. Technol. Int.* **3**, 40－43 [originally printed in *BioPharm*. 1990 **3** (9), 26－30].

Sassenfeld, H. M. (1990) Engineering proteins for purification. *Trends Biotechnol.* **8**, 88－93.

Scopes, R. (1987) Dye ligands and multifunctional adsorbents: an empirical approach to affinity chromatography. *Anal. Biochem.* **165**, 235－246.

Scopes, R. (1996) Protein purification in the nineties. *Biotechnol. Appl. biochem.* **23**, 197－204.

Shamey, E. Y. *et al*. (1989) Stabilization of biologically active proteins. *Trends Biotechnol.* **7**, 186－190.

Thommes, J. & Kula, M. (1995) Membrane chromatography-an integrative concept in the downstream processing of proteins. *Biotechnol. Progr.* **11**, 357－367.

Protein characterization

Kemp, G. (1998) Capillary electrophoresis: a versatile family of analytical techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **27**, 9—17.

Novotny, M. (1996) Capillary electrophoresis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 29—34.

Roepstorff, P. (1997) Mass spectromertry in protein studies from genome to function. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 6—13.

(周晓巍　王宇新　译)

第4章

大规模蛋白质纯化

4.1 一些基本原则

第 2 章讨论了蛋白质的各种来源，第 3 章讨论了蛋白质的纯化与鉴定方法，两章中所介绍的基本原理经放大以后同样也适用于实验室及工业规模的操作，其实第 3 章已讨论了一些与大规模蛋白质纯化相关的问题。

工业规模上，蛋白质产品的生产通常分为上游和下游处理过程（图 4.1）。上游指进行蛋白质生物合成的生产阶段，因此，对大多数蛋白质来讲，这个阶段指的是微生物细胞发酵或动物细胞培养。在工业规模上如何进行这些操作超出了本章的范围，感兴趣的读者可参阅本章后面所列出的参考资料。

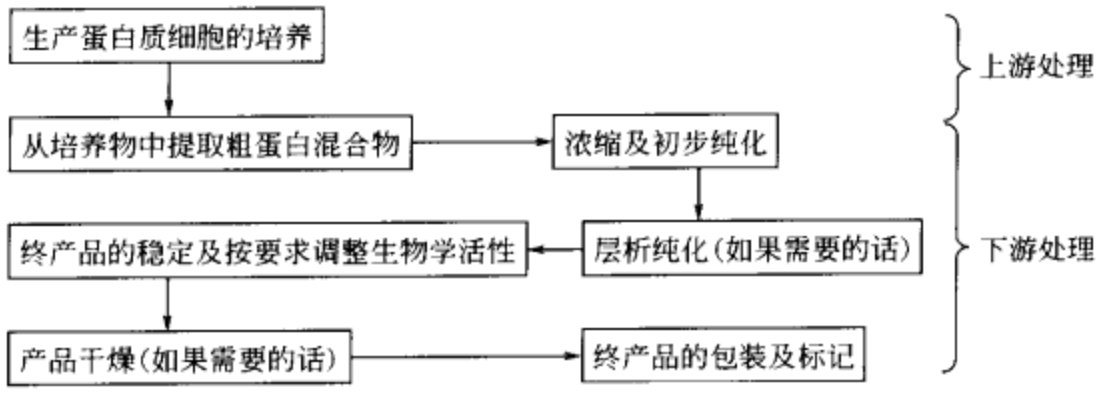


图 4.1 蛋白质生产上下游主要步骤流程

详见正文

下游处理指的是从培养物中提取蛋白质及后续的纯化过程，也包括一些另外的内容，如质量监测、终产品的稳定性、将产品效力调整至一定的范围、将产品装入合适的终容器以及对容器进行标记等。在设计下游纯化方案时需要遵循一些原则，但这些原则是一般性的，对于特定的纯化系统并不一定合适。这些原则包括：

① 对初始材料的特性应该进行深入细致的研究，以便制定出合理的纯化方案。同时对终产品纯度要求必须非常明确；

② 纯化方案应尽可能简化以便实践中能在最短的时间内得到最多的终产品；

③ 分离技术（以及分离时的环境条件）的选择应利用目标蛋白与杂质间理化性质上的最大不同点；

④ 高选择性的步骤应尽量安排在纯化的前期，这样可以减少为获得理想纯度的蛋白质所必需的后续步骤；

⑤ 如果可能的话，成本最高的处理步骤应尽量安排在纯化的后期。

如果纯化的蛋白质只是用来研究，在设计纯化方案时只需考虑技术问题，通常只以获得均一性的蛋白质为目标，而对其他一些因素如所能达到的产量百分比、纯化所需时间及费用等则考虑较少。而在生产商业蛋白质时，还必须考虑费用问题，通常还需考虑管理机构制定的一些相关条款问题。按商业上的思维，应该用最少的钱来获得符合要求的产品。对用于治疗、诊断及食品用途的蛋白质，还必须考虑管理机构如美国食品与药品管理局（Food and Drug Administration，FDA）发布的生产原则。在设计下游处理程序时，终产品纯度是首要的考虑因素，这一般取决于其用途。通常来讲，只要能获得所需的终产品，下游纯化的规模应尽可能小，纯化方案中不必要的步骤常常会降低产品的生物稳定性，而且当纯化步骤增加时，终产品的产量也会随之下降。大多数工业生产的蛋白质属于以下两大类。

一类是大批量生产的蛋白质，通常是相关的粗提物。这些蛋白质通常是食品和饮料加工工业中广泛使用的酶类（见第 10～12 章），或者是一些奶源性的食用蛋白（第 13 章）。

另一类是治疗或诊断用的蛋白质。这类蛋白质与大批量生产的蛋白制剂相比通常生产量较少，但需要达到很高的纯度。

用于治疗或体内诊断的蛋白质需经过更为严格的纯化，因为目标蛋白以外的杂质分子在临床上可能会有副作用，体外诊断和分析用的蛋白质通常也是高度纯化的，但在这种情况下其纯度较体内使用的蛋白质要求还是要低一些。在一些情况下，下游纯化时特异地去除污染的蛋白质比达到同质性更为重要。本章其余部分主要来讨论大规模蛋白质纯化问题，但也会介绍一些商业上生产蛋白质的例子。

4.1.1　蛋白质纯化的规模化

工业规模的蛋白质纯化方案起初都是按实验室水平设计的，但为了能以尽可能少的成本生产市场需求的蛋白质产量，需要进行规模化生产的研究。通常来讲，生产规模越大，生产成本越低。因为：

① 大量购买时，所需的许多化学试剂和原材料的价格可以更便宜一些；

② 许多管理费用并不随着生产规模的扩大而增加；

③ 生产规模扩大时，劳动力成本（以生产单位产品计）急剧下降。

许多实验室纯化时所用的技术及程序并不适合于大规模的纯化。如许多用于实验室中破碎细菌细胞的方法，由于技术或成本方面的问题，在规模化生产时并不适合。在小规模时，超声破碎细胞壁是可行的，但在大规模生产时效率很低，用溶菌酶处理，从成本上来讲也是不经济的。其他一些在实验室纯化过程中比较常规的技术，要想成功地应用于大规模生产，必须进行一定的修改。如实验室纯化中，离心通常是分批（固定体积）进行的，但在工业化纯化系统中，就需要改为连续的流式离心（第 3 章）。因此，在设计实验室纯化方案时，从头至尾都要考虑每一项技术在规模化生产时的放大问题。

对于生产治疗用途的蛋白质来说，合理地设计一个纯化程序使得其中的每一个步骤都可以直接进行放大，是非常重要的。这些蛋白质刚开始时都是经小量生产后用于动物试验，如果效果较好，接下来就会开展一定范围的临床试验，这些试验，所需蛋白质的量很少，但通常需要数年，而且其他相关的费用相当昂贵。如果能证明该蛋白质是安全的且治疗效果理想，就需要根据市场需求将生产规模进行扩大再进行一定的临床试验。然而在将纯化系统规模化时，原始纯化程序中任何的改变，都可能使终产品改变，从而不能达到临床试验时的效果，因此，在这种情况下，确保起初实验室的纯化系统能够规模化放大是至关重要的。图 4.2 列出了蛋白质纯化规模化的 3 个阶段。

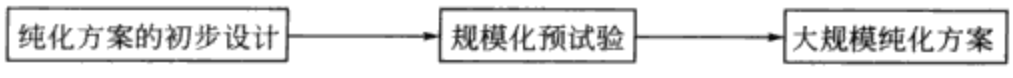


图 4.2　设计与放大蛋白质纯化方案时的流程

在实验室进行小规模的纯化来确定获得理想纯度的蛋白质所需的最少步骤，然后进行规模化预试验观察和解决纯化规模放大时出现的问题，最后进行大规模纯化

小规模和大规模纯化系统没有明确的界限。实验室规模的纯化常用来生产微克至毫克级的蛋白质，规模化预试验一般可得到克级产品而大规模纯化可得到公斤级的产品。刚开始时，对任何一种蛋白质，因为确定其市场需求量很难，因而难以选择哪一种规模的纯化方案。尽管现在市场上有数百种蛋白质类产品，但大多数的产量都较小，年产量在公斤级的蛋白质不超过 100 种，年产量超过 1000 公斤的就更少了（见表 3.1）。

4.1.2　纯化系统的规模化

不论是对科研人员，还是对工程师来讲，纯化系统的规模化都是一个难题。工程师主要负责设计和安装规模化地成功生产蛋白质产品的设备。从图 4.3 可以看出，这绝非易事。

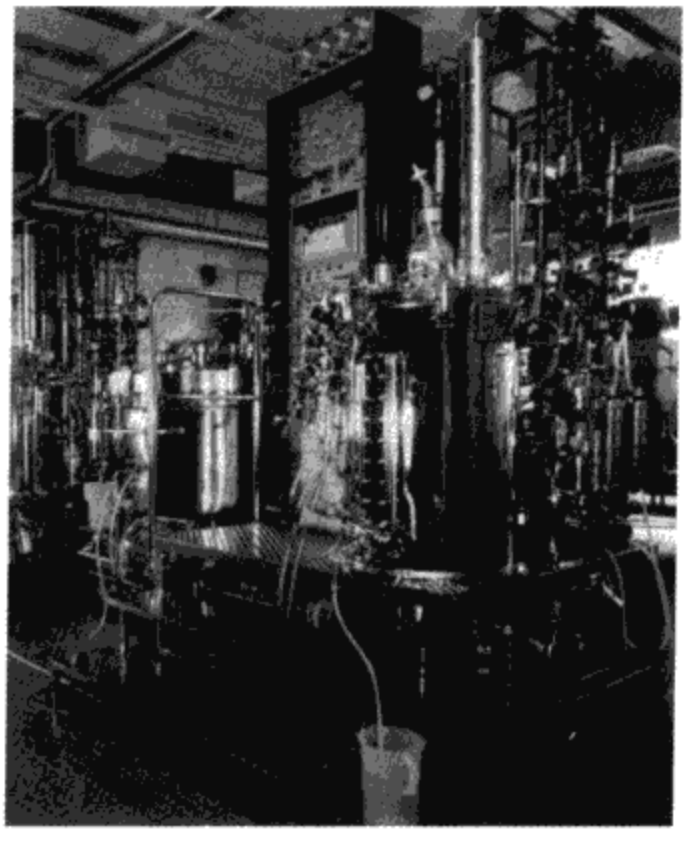


图 4.3　Boehringer Mannheim 公司发酵车间的生物反应器照片

经 Boehringer Mannheim，UK 允许

许多大规模处理设备如容器和转移泵，是用不锈钢或聚丙烯塑料制成的。实验室纯化中广泛使用的玻璃器皿，由于其易碎的特点，在大规模纯化中很少使用。在生产纯化所需的容器中，使用的不锈钢或塑料制品的等级也必须精心挑选，它们须是惰性的，能抵抗纯化过程中所用的化学物质的腐蚀，而且不会给产品中混入任何潜在的有毒金属或化学物质。

在实验室纯化中，通过从一个容器倒入另一个容器可轻易完成的液体转移，在用于生产的规模化纯化中却必须由泵通过一系列的不锈钢或塑料管来实现。有些泵由于在转移蛋白质液体时会存留气体，从而造成蛋白质降解，因而只有经特定设计的泵才适于转移液体蛋白质溶液。

制备级的层析设备通常在设计上以及外观上也同实验室规模的纯化系统有所区别。许多小规模层析柱是用玻璃或透明塑料做成的，容量从 1ml 至 200ml 或 300ml 不等。制备型色谱柱容量的跨度从

几百毫升到几升，有时可达几百升。这种柱子中一些是用玻璃做的，但大多数的都是用增强塑料和不锈钢做的。扩大规模时通常不增加柱的长度而是通过增加柱的直径来实现，商业上可提供直径为几米的柱子。在一些层析系统（如凝胶过滤层析）中，分离度与柱子的长度成比例，由于凝胶珠可被压缩，因而在放大规模时会更难，这些问题可通过应用具有更好结构特性的凝胶类型或改变柱子的设计来解决。在许多工业上重要的蛋白质如胰岛素的制备级凝胶过滤中，经常还会使用重叠柱（见第 3 章和第 7 章）。

有几家公司设计、生产并且提供全套的、用于大规模纯化的色谱系统。许多这种系统不仅包括所需的处理设备，而且包括可实现高度自动化的计算机控制单元。通常来讲，由于以下两个原因，下游处理技术上的革新并不多。①生产和销售食品及保健用途的蛋白质产品的许可证是由管理机构如 FDA 等颁发的，如果采用已被确认并鉴定过的下游处理程序更容易获得认可；②许多制造商会将下游处理的成本简单地加到终产品价格中，而更高纯度的蛋白质需要更高销售价格来维持。随着生产厂商之间的竞争日渐激烈，占整个生产成本 80%的下游处理成本在产品竞争性方面显得越来越关键，因而厂家不会为尝试获得高纯度的蛋白质产品而轻易地增加生产成本。

4.1.3　大批量蛋白质生产

工业规模的酶是批量生产的，通常下游处理过程也很少。占有这种批量生产的酶中较大比例的是生物高分子降解酶如淀粉酶、蛋白酶和胶质酶（第 10 章）。这些蛋白质是通过各种微生物（重组或非重组）尤其是杆菌或者某些曲霉菌发酵而胞外生产的。许多这些批量生产的酶制剂只是其浓缩过的不含细胞的发酵产物。

图 4.4 列出了从微生物中制备酶制剂的常规下游处理流程。发酵过程中，当目标蛋白的产量达到最大时，将发酵培养物冷却到 5℃以下，这样可使蛋白质产物保持稳定，同时抑制微生物的进一步生长。然后，通过经典的离心或者过滤的方法将微生物细胞从培养基中去除，为了得到黏附在细胞上的酶产品，通常需将收集的细胞洗几次，并将洗脱液加到含有大

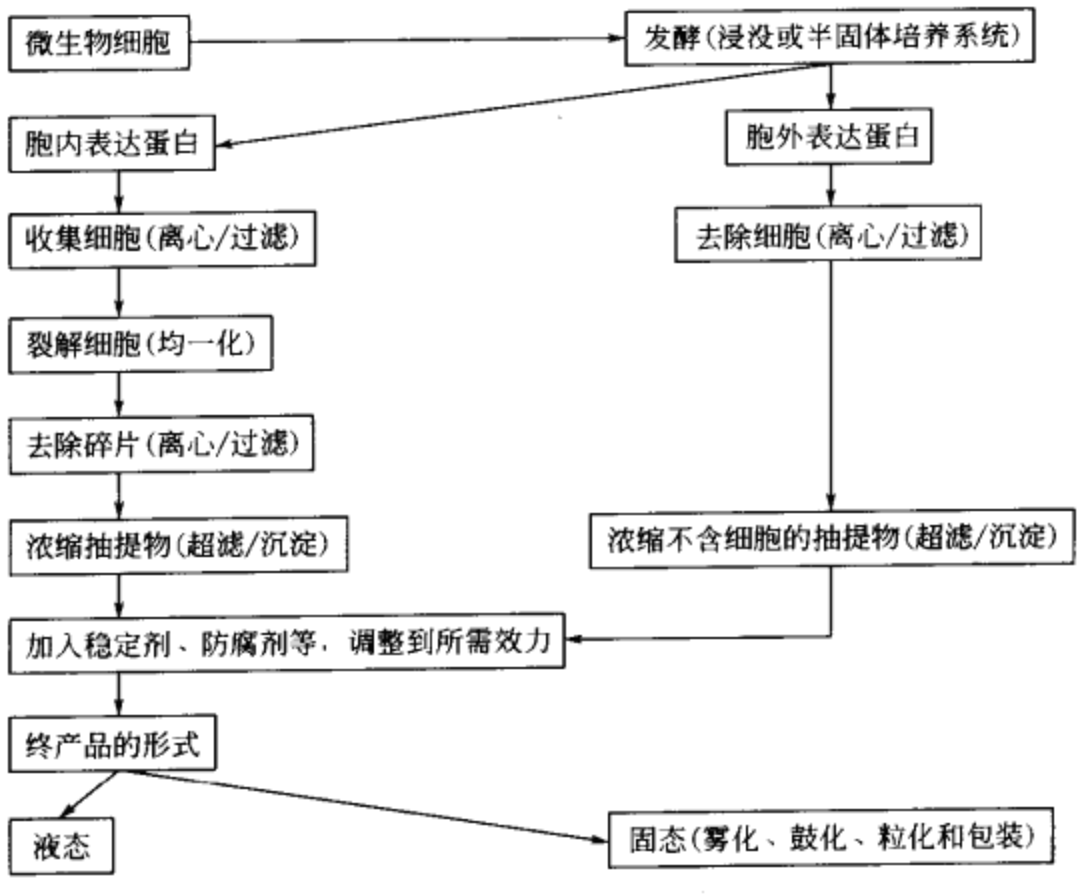


图 4.4　从微生物细胞中批量生产蛋白质的流程

多数目标蛋白而不含生产细胞的培养液中。如果酶是常规的胞外分泌的话，首选方法是过滤。如果酶在胞内，通常需要连续离心收集细胞，然后将其重悬在水或缓冲液中，破碎细胞使胞内物质释放出来，再离心去除完整细胞或者细胞碎片，这时目标蛋白就应该在上清液中了。如果是通过重组 DNA 技术生产酶产品，管理法规通常要求在处理之前增加一个特异的处理将所有生产目标蛋白的微生物细胞（经遗传修饰）全部杀死。

不论目标蛋白是分泌的还是胞内的，接下来通常都要进行浓缩，因为将处理体系的体积降到利于操作的范围是很必要的，尤其是对于存在于大体积发酵液中的胞外分泌酶来讲更是如此。这一步通常是通过低温蒸发和最近发展起来的超滤来实现的，有些情况下可通过真空蒸发进行进一步的浓缩，正如其名，真空蒸发是给加温到 40℃的含酶液体施加一个真空来进行浓缩。随后，为了除去提取物中可能残留的微生物，可再增加一步过滤，这时通常会采用一种纤维素纤维深层过滤器（a cellulose fibre depth filter）。

如粗制的酶制剂要做成液体形式，下游纯化的最后通常会加入各种稳定剂和防腐剂，以增加产品保存期。常用的防腐剂和稳定剂有丙二醇、甘油和山梨醇。根据对终产品酶活力的要求，可将产品的终体积进行适当的调节，然后装入桶内并在低温下保存。有些酶制剂是制成酶浆的，这时需在酶制剂中加入硫酸铵、硫酸钠或氯化钠等促进酶沉淀和结晶，其他物质如二氧化硅等的加入则可使酶保持悬浮。大多数情况下酶在酶浆中要比在溶液中的酶活力保持时间长。

许多批量生产的酶制剂是以固态形式销售的。最简单的生产酶粉剂的方法是将加入稳定剂并经最后过滤纯化的酶浓缩物进行喷雾干燥（简称“喷干”）处理。喷干法基本上包括使含酶的液体或酶浆产生微粒气溶胶，并将其导入到热气流中，从而使得微粒中的水蒸气蒸发（见图 4.5）而获得固态的酶颗粒。如有必要，喷干法制备的酶制剂可进一步经真空炉抽干。然后将干燥后的酶制剂混合成粉剂，并可通过在其中添加适当的粉状稀释剂将其酶活性调整到所要求的水平。

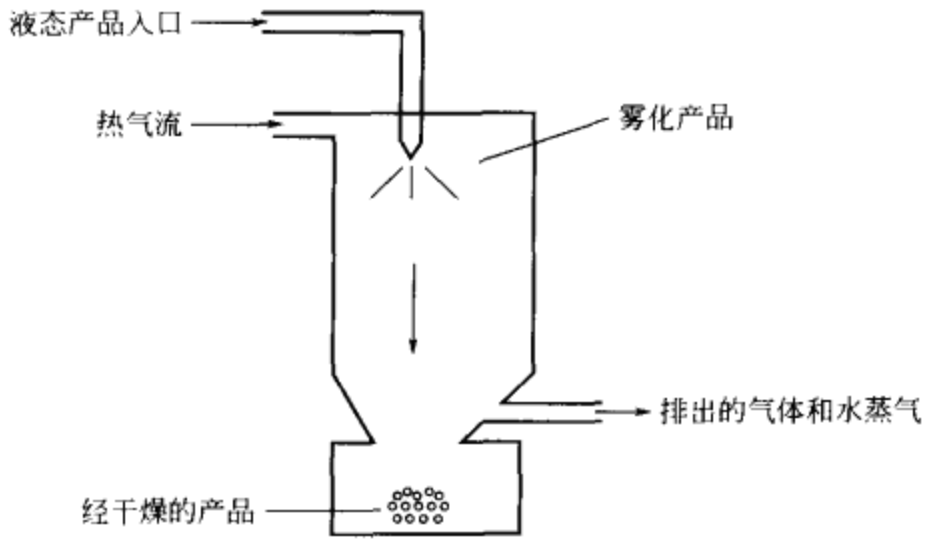


图 4.5　喷雾干燥过程示意图

首先将高度浓缩的蛋白浆或蛋白液体雾化形成小的产品微粒，在系统中加入热气流，同雾化的产品共同流经干燥室，这时，干热的空气与湿的产品相接触，产品被热空气干燥。干燥的产品被收集在干燥室的底部，而湿的空气经右下角的出口排出

粉状酶制剂在其处理过程中容易形成大量的灰尘粒子，这是不利的，当从事下游处理的工作人员或终产品的使用者暴露于这些含酶的灰尘粒子时，可能会引起严重的过敏反应（见第 10 章），通过将酶制剂包起来可解决这个问题。起初，包裹酶制剂是通过将酶与液态石蜡混合，然后再喷干，这种被称为造粒的过程可得到蜡与酶均匀分布的颗粒。另一种方法是先将纯的酶团颗粒化，然后再在其外层包裹上一层蜡，这样不仅有利于保持胶粒的完整性，还

可将随后的灰尘产生程度降到最低。总之，造粒技术在减少由于灰尘形成所造成的健康危害的同时，也可使其同清洁剂的再次全面混匀。

以粉剂形式销售的批量生产的酶制剂包括淀粉处理工业中应用的各种微生物的淀粉酶、使果汁澄清的果胶酶以及加入去污剂中的蛋白酶（见第 11、12 章）。这些制剂很不纯，其酶活性也不超过占终产品中总蛋白质的 2%～5%，所有这些酶产品通常也需要进行毒性及过敏性测试。

商业上奶源性的酪蛋白、乳清以及动物蛋白如明胶等都是大量生产的，工业化制备这些蛋白质的方法根据蛋白质的不同也有相应的不同，在第 13 章中列出了规模化生产的蛋白质及其相应的纯化方法。

4.1.4　治疗或诊断用途的蛋白质的纯化

治疗及诊断用的蛋白质的纯度要求非常高，尤其是对于非经胃肠道途径如注射、输液及静脉推注等使用的蛋白质制剂。为了减少和消除产品中微量污染的杂质所造成的临床负反应，这种高纯度要求是很必要的。本章接下来将具体讨论这些问题。用于体外诊断及分析的蛋白质产品也必须进行一定的纯化，以去除可能对诊断结果有影响的杂质。

这些蛋白质的下游处理不仅包括常规的处理，而且还需要几次高分辨率的层析（第 3

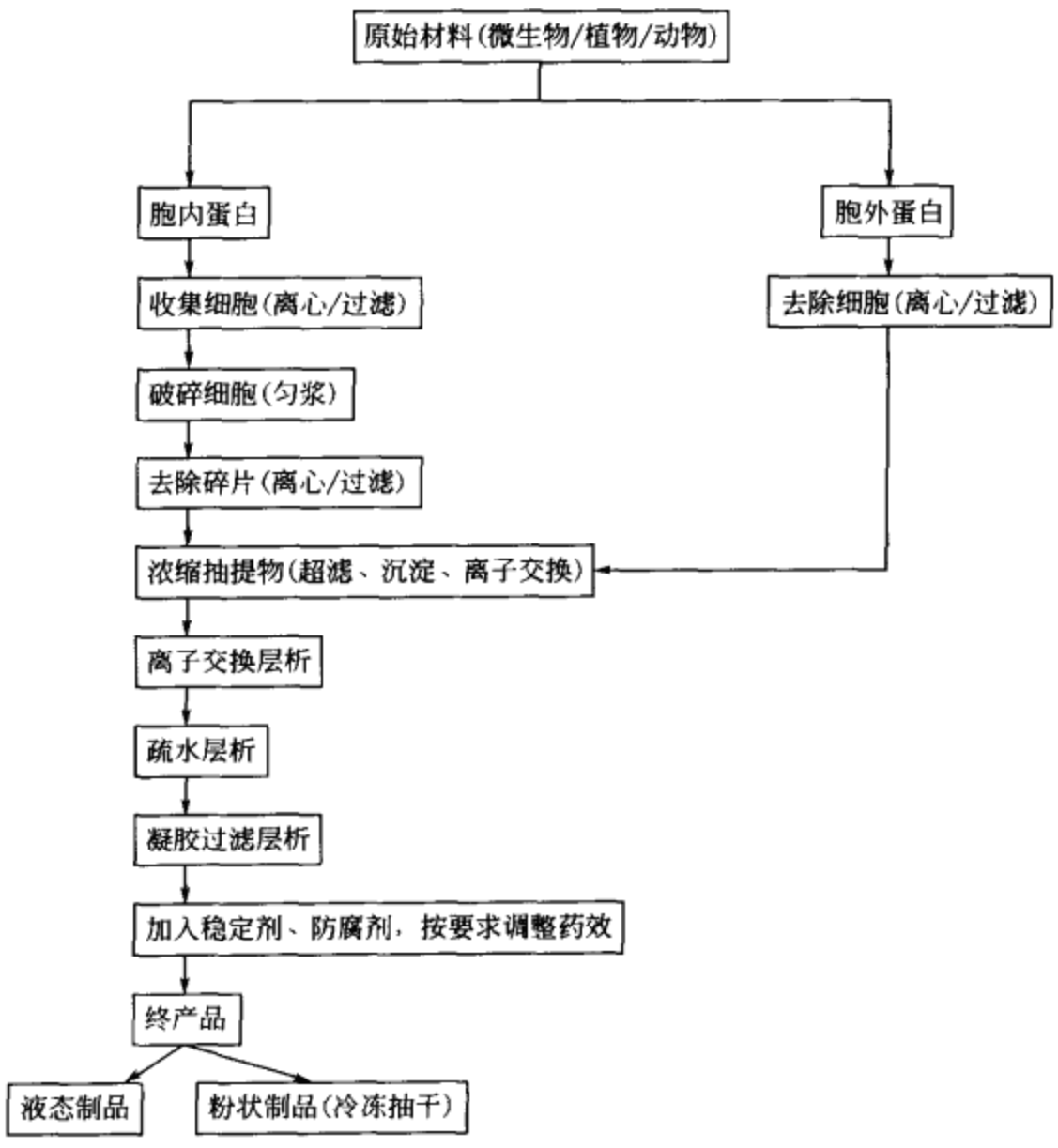


图 4.6　治疗和诊断用蛋白质产品的生产过程（大概要点）

要确保完全去除非蛋白杂质，可能还需要加入其他步骤，有时会用到的层析种类包括亲和层析或层析聚焦，治疗性用途的终产品纯度范围一般是 98%～99%，此外还需要增加多个质量控制步骤

章)。图 4.6 列出了经典的纯化全过程的流程图。如果目标蛋白是分泌到胞外培养基中的，起始的纯化步骤包括通过离心或超滤将细胞去除；而如果目标蛋白是胞内的，细胞收集后则通过匀浆破碎细胞，此时如果胞内蛋白是可溶的，就通过离心去除全细胞及细胞碎片；而如果蛋白质是以包含体形式积累的，则匀浆之后通过低速离心收集包含体，清洗之后，再通过适当的方式溶解包含体（第 2 章）。

对于非胃肠道使用的蛋白质产品来说，至少要进行 3 次层析纯化。尽管有许多种层析技术，但在工业上最常用的是离子交换（最普遍）、亲和层析、疏水层析和凝胶过滤层析。由于以下几个原因，凝胶色谱层析通常被安排在最后一步：首先它可以有效地区分在前面纯化过程中形成的蛋白质二聚体或高分子量聚合体；也能有效地去除亲和层析遗留下的配体分子；但是，凝胶层析柱的装载量较小，而且层析时流速要慢，因此其操作成本通常很高，对于下游处理来讲，“时间就是金钱”这句格言说得太对了。此外，通过凝胶过滤，可用相关的洗脱液清洗而将终产品蛋白质置换在利于最终处理或贮存的缓冲液中。

尽管像 FPLC 等中等压力的制备系统以及高压制备系统在工业上越来越重要，但至今许多层析系统还是在低压条件下进行的（第 3 章）。层析每一步中的纯化度可以通过分析目标蛋白在总蛋白中的含量来监测。

不像传统的药物制剂，许多治疗性蛋白质是热不稳定的，温度高于 40～50℃时会失活。因此，对产品最后进行热灭菌（如高压灭菌）处理是不可取的，而且在许多情况下，由于没有合适的放射设施以及有些蛋白质会受放射影响，因此放射灭菌在实践中也不太可行。

治疗和诊断用蛋白质通过过滤灭菌接着将其经严格的无菌技术转入终容器（提前灭过菌的）中。过滤灭菌使用 0.22μm 或者孔径更小的滤膜，这些滤膜可以除去细菌和真菌，但不一定能去除所有的病毒和支原体。过滤过程中还经常在 0.22μm 的滤膜过滤之前通过嵌入的 1.0μm 或者 0.45μm 孔径的滤膜进行一次过滤。在过滤过程中，所用的滤膜决不能影响产品，因此纤维素滤膜应避免使用而且要确保产品的成分在过滤过程中没有改变或减少。在完成一次过滤后还应检查滤膜的完整性。

在无菌条件下制备产品时污染的可能性与下列三个参数有关：①空气中微生物的浓度；②用来装产品的容器的瓶口直径；③开口的容器暴露于环境中的时间长短。以上任一参数值的减小都减少了无菌充装过程中偶然的微生物污染的可能性。空气中微生物的浓度可以通过在一个清洁的环境中执行所有的操作和减少无菌操作过程中参与的人数来减少。从这个角度考虑，设计和安装高度自动化的无菌充装设备应该可以大大地减少污染的可能性。许多自动化的充装设备可以买到，而且有些可以原地清洗并接着进行蒸汽灭菌。为了进一步减少污染的可能性，用来充装的容器口的直径应尽可能小，而且充装操作应该以最快的速度进行。用来进行无菌充装的灭菌的液态制剂可以加入一定终浓度的适当的抗微生物的防腐剂。如胰岛素注射液，通常含有 0.1%～0.25%的苯酚或甲酚作为防腐剂。如果终产品是以粉剂的形式出售的，可以按第 3 章中介绍的方法对其进行冻干处理。

4.2 治疗性蛋白质产品——一些特殊的问题

在生产不经胃肠道使用的治疗性蛋白质产品时，还必须严格遵守一些规范。因为这一类的药物使用模式会使蛋白质或药物直接地进入血流，人体通过对外源分子天然的同化机制如

皮肤或胃肠道防御系统无法起作用，所以在生产这些治疗性蛋白质产品时所采用的操作方案的每个方面都必须按照很高的安全标准来考虑。操作过程必须在经严格控制的环境（清洁的环境）下进行，与产品直接接触的设备的清洁、净化和消毒也尤其重要。制造过程中使用的溶剂或稀释液基本上都是高纯度的水，称作注射用水（water for injections，WFI）。WFI 通常都是在生物制药厂内部通过将去离子水进行蒸馏和反相渗透制备的（见图 4.7）。

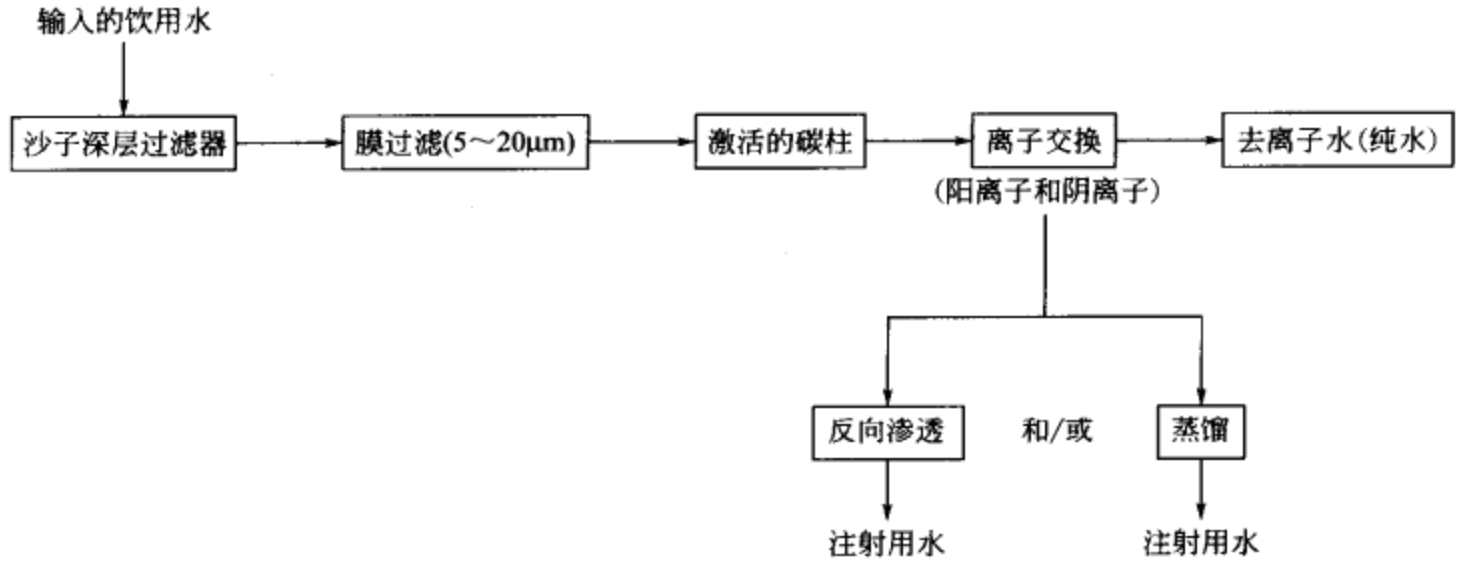


图 4.7　饮用水纯化为生物制药用水的一般系统

通过阳离子和阴离子交换柱的水称为“纯水”或“去离子”水。注射用水的生产还需后续的蒸馏或反向渗透步骤

4.2.1　清洁区

清洁区是指内部综合环境条件受严格控制的经特殊设计的房间。这些房间的房顶上安装有高效的微粒空气过滤器（HEPA 过滤器），进入清洁区的所有空气都通过 HEPA 进行过滤。根据过滤器清除微粒物质的能力可对其进行分级。房间内的空气通常经装在刚刚高出地面的墙上的特殊的出口流出房间，而 HEPA 过滤器一般平整地放在屋顶区的上方以产生经过滤的相对均衡的向下气流至整个房间（图 4.8）。

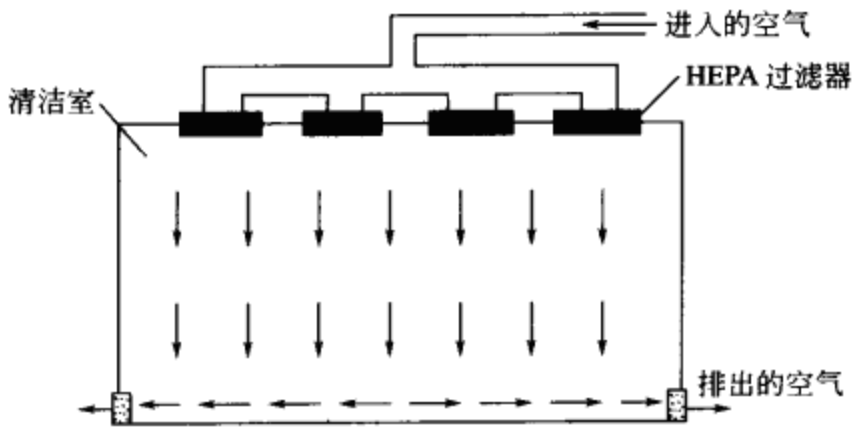


图 4.8　通过清洁的房间的 HEPA 过滤的空气流的示意图

4.2.2　清洁、去污染和消毒

清洁，也可称作去“脏”，这里的“脏”包括常规的下游加工中在加工设备和加工区域中积累的有机物质和无机物质。这样，目标蛋白洗脱后层析柱上滞留的任何蛋白质或其他分子均被认为是“脏物”。去污染指的是不合需要的物质如内毒素、别的热原物质以及其他的有害物质如病毒等的灭活和清除。消毒指的是有生命力的有机物的清除和失活。在大多数但并不是所有情况下，清洁程序同时也是很有效的净化和消毒手段，这些程序既被用于加工设备，也用于进行生产过程的加工区。加工设备的清洁、去污染和消毒是任何一种制造程序的

组成部分（表 4.1）。

能够被分离和拆除的加工设备，相对来讲，比较容易清洁和消毒，因为这样加工容器可用高纯度的水进行彻底的冲洗和擦洗。也可以使用清洁剂，但随后必须用注射用水清洗干净。可拆卸的管子也可以用相似的方法进行清洗。泵及其他设备如离心机如果可能的话都要拆开，以便对其组成部件进行彻底的清洗。这样的清洁程序可去除所有的“脏”物，也可明显地减少有生命力的微生物，但并不能够保证无菌。组成部件可用多种方式如湿热和干热、放射照射及化学试剂等方式进行灭菌。用化学试剂如甲醛、次氯酸盐和过氧化物等对任何处理设备进行灭菌时，必须非常小心，以防止痕量的这些化学物质残留在消毒的设备上，这样在后续的生产过程中会污染产品。许多处理设备以及辅助设备如软管和别的塑料材料都可以通过高压进行有效的灭菌，在用之前，大部分过滤器都需要安装在它们后面的机架（通常是不锈钢模具）上，同样也进行高压灭菌。

用通过蒸气流的方法，并保持一段适当的时间，可对加工设备如金属管或一些容器的内表面进行灭菌。对没有从它们正常运行部位分解或拆离的固定设备进行清洁和消毒，通常称为原位清洁（cleaning in place，CIP）。所有的加工设备都需要进行定期的清洁，但只有那些与产品直接接触的设备件才需要经常灭菌。

层析系统需要定期的清洁、净化和消毒，这些系统通常是在原位进行清洁的。在装柱或重装柱之前，柱子和凝胶基质可以分开清洁或灭菌。灭菌之前，层析柱应该拆下来并细心地清洁，首先用适当的清洁剂，然后用高纯度的水进行彻底的淋洗，接下来，根据柱子制造材料的不同可以通过高压灭菌或用化学试剂如氢氧化钠（NaOH）进行处理。尽管在某些情况下使用化学物质如次氯酸盐或过氧化物进行处理，但大部分的层析介质是通过高压灭菌的。

治疗性蛋白质生产中清洁、去污染和消毒所要清除的杂质为：细胞碎片、沉淀或聚集的物质、一般的微粒物质、热原物质、病毒粒子、微生物、前面生产循环残留的痕量蛋白质或其他分子、脂及其相关物质。

在用相关的凝胶材料包装柱子时，很有必要设计一个方案来使层析系统得到有效的原位清洁（CIP）。有几种清洁剂和消毒剂可以使用。在完成一次生产后，用几倍于柱体积的水或适当的缓冲液冲洗可冲出许多柱的污染物。用浓缩的中性盐溶液如 KCl 或 NaCl，通常可以有效地清除沉淀的或聚集的蛋白质，或其他微弱地结合于凝胶上的分子。在缓冲液中加入螯合剂如 EDTA 有助于清除依然结合在凝胶上的金属离子。为了清除紧密结合的物质，接下来可以用 NaOH 溶液清洗，在某些情况下也有用清洁剂的。另外在一些情况下，柱子可能被脂类物质污染，这种情况非常麻烦，因为脂类物质在 40～60℃ 是可溶的，所以将柱子的温度升到这个温度可能会有效清除脂类，但这种方法只有在这样的温度变化不对层析柱的分级特性造成影响的情况下才可以使用。

氢氧化钠是一种广泛应用的原位清洁试剂，它不仅可以有效地清除紧密结合于凝胶基质上的多种污染物，而且可以清除和破坏热原性物质如细菌内毒素、病毒颗粒以及细菌等。氢氧化钠的广泛应用不光是因为它是一种有效的清洁试剂，也与其容易购买和价格便宜有关。

生物源性材料中是否含有病原性病毒颗粒一直是一个备受关注的问题。许多病毒含有致癌基因，有的还是一些严重疾病如肝炎或艾滋病的病原体。而 NaOH 可在几分钟之内灭活艾滋病毒。

NaOH 作为一种清洁剂和消毒剂，其效果取决于所使用的浓度和作用的时间。通常情况下，NaOH 是以 0.5～1.0mol/L 的浓度使用的，与凝胶的作用时间应达到一个小时或更长时间，而且必须在凝胶及柱子的所有组分与其相容时才能使用。许多层析介质可以在

NaOH 中保持一定的时间而不会对其产生负影响，但硅胶不行，因为其在 pH 值高于 8.0 时就会马上溶解。在与 NaOH 接触之后，层析介质应该立即用无菌、无热原的水或合适的缓冲液进行全面的冲洗，这种在原位清洁后对 NaOH 进行有效的清除是很必要的，它可以防止长期暴露于碱性条件下所引起的柱子变质，并可确保下一次生产时产品免受残余的 NaOH 的污染。

如果能在整个层析系统的设计过程中考虑工序卫生的话，对其进行有效的原位清洗就会大大地简化。如凝胶和柱子种类的选择决定了可以使用什么样的原位清洁试剂，层析柱及其辅助设备的设计决定了其对微生物污染的易感性，而阀门和管道的连接处是最容易被微生物污染的部位，尤其是管道连接处的设计不能含有清洗时的盲区。

4.3　蛋白质类治疗性产品中杂质的种类及其在医学上的意义

对于非肠道使用的蛋白质，决不能含有任何可能对使用此类药物的患者有负作用的杂质成分。表 4.1 中列出了常见的杂质。

表 4.1　治疗性蛋白质产品中杂质的种类及其在医学上的意义

杂　质	医学后果
微生物	可能产生严重的微生物感染——败血症
病毒粒子	可能产生严重的病毒感染
热原质	发热反应，严重时导致死亡
DNA	不太清楚——有可能会产生免疫反应
污染蛋白	免疫反应。如果具有不利的生物活性的话可能产生负效应

下游处理中所用的大部分技术是用来将蛋白质分子彼此分开的，也就是说将目标蛋白从起始材料中的数百种、大多数情况下甚至是数千种蛋白质中纯化出来。大多数情况下，也可以通过下游处理过程中一步或多步的蛋白质分馏步骤将非蛋白质类的杂质有效地清除，但在一些情况下，要清除某些杂质，必须使用一些特殊的程序。

这一章接下来的部分主要来讨论蛋白质产品中各种潜在的杂质、其在医学上的意义以及从终产品中减少和清除这些杂质的方法。

4.3.1　微生物污染物

非肠道使用的治疗性产品，除了活菌苗之外，必须是无菌的。终产品中微生物的污染，不仅会存在产品的微生物降解问题，而且会在受体病人中引发严重的微生物感染。将有生命力的微生物直接导入血流可引起一系列严重的疾病，如主要特征是由血流中的病原菌或其产生的毒素而引起的各种组织的大范围的损伤或败坏的败血症等。

在下游处理过程中，大部分的蛋白质产品都会存在微量的微生物污染。有些情况下，这些微生物是曾用来生产目标蛋白的，而其他情况下，微生物污染物则来自周围环境、无菌处理设备以及从事下游处理的工作人员。

在一些情况下，产品的处理过程中需进行一次或多次的过滤。在下游处理过程中，可在某些关键点对产品进行取样，通过微生物分析确定微生物的含量，并在此基础上决定是否增

加过滤步骤。同时，下游处理过程中各个关键性的工作点和正常的工作环境中都要放置开盖的琼脂糖平板，如果这些平板上长出的微生物很多，说明在此阶段产品可能被微生物污染，接下来就必须采取适当的措施来鉴定、减少或消除污染的微生物。

4.3.2 病毒污染物

通常认为传统的化学药物不存在病毒污染，但是治疗性蛋白质产品则可能存在这种污染。大部分人可能认为病毒是来自下游处理过程中被病毒感染的工作人员或污染的设备，但通常情况下，病毒颗粒是来自感染的起始材料。利用人的组织、血液或尿制备的产品可能含有许多人类病毒污染物（见表 4.2）。艾滋病毒和乙肝病毒是两种最常见的污染物。

表 4.2 人志愿者生物原材料中可能存在的病毒污染

病　毒	医学意义
人免疫缺陷病毒	艾滋病的病原体
乙肝病毒	乙型肝炎的病原体
人类 T 淋巴瘤病毒(HTLV-Ⅰ,HTLV-Ⅱ)	可引起白血病
单纯疱疹病毒(HSV)	HSV-1 是疱疹性口腔炎、唇炎和角膜结膜炎的主要病原体;HSV-2 是生殖器疱疹的主要病原体
人类乳头淋巴瘤病毒	是普通疣的病原体,也与肛管癌有关
巨细胞病毒(CMV)	通常没有症状,但在免疫失调的病人中会引起严重的机会性感染
E 病毒(EBV)	会引起与 Burkitt 淋巴瘤和鼻咽癌相关的感染性单核细胞增多症

一些不经肠道使用的蛋白质是牛源性的，如胰岛素和促卵泡激素。此外，细胞培养基中常会含有牛血清和胎牛血清。像人源性蛋白质一样，牛源性的蛋白质通常也是从混合样品组织中纯化到的，这样只有其中的一个样品有污染，所有的起始材料就会被污染。牛源性生物产品中最可能的污染病毒包括感染性的牛鼻气管炎病毒和牛免疫缺陷病毒。

动物细胞培养是某些治疗上有益的蛋白质生产的重要途径，因此许多鼠病毒如淋巴脉络从脑膜炎病毒就可能是用鼠杂交系生产单克隆抗体时潜在的污染源。在许多治疗性重组蛋白生产过程中所用的中国仓鼠卵巢细胞（chinese hamsterovary，CHO）或仓鼠肾细胞（baby hamster kidney，BHK）也可能携带有细胞病毒（第 5～8 章）。

通过使用无病毒污染的原材料大多数情况下可以有效地清除病毒污染及其相关的潜在的健康问题。纯化开始前要对每一个起始组织进行检验以清除所有的带病的样品，且供体兽群不能带病。动物细胞培养技术的发展实现了无血清培养基的细胞培养，是一个很大的突破，有效地消除了这些细胞产品受牛源性病毒污染的可能性。同时，用重组微生物系统生产治疗用蛋白质也减少了终产品受临床上重要病毒污染的可能性。

为减少终产品中的病毒污染，通常采用两种策略：第一种是在下游处理过程中加入破坏病毒的特殊的步骤；第二种是确保一个或多个纯化步骤可以有效地从目标蛋白中分离出污染的病毒颗粒。

在许多纯化程序中没必要都进行专门的病毒灭活，一些缓冲液成分或其他的化学添加剂就可以灭活许多脆弱的病毒颗粒。可用来专门灭活病毒的步骤包括热处理和放射性处理。将温度提高到 35～60℃并维持几小时可灭活大部分病毒，广泛应用于灭活血源性的病毒，一些最新的研究调查了高温短时间的灭病毒效果。紫外照射也被作为一种灭活病毒的手段在应用，其他一些方法如暴露在极端的 pH 条件和通过 0.1μm 或 0.2μm 的滤膜进行多次重复过

滤等尚需进行评价。但这些方法可能会对目标蛋白有一定的损害。

蛋白质纯化系统中的许多步骤可以有效地将病毒颗粒从蛋白质中分离出来，尤其是对于层析分离来说。病毒颗粒和蛋白质分子具有许多不同的理化特性，某些情况下，病毒污染物会吸附在层析柱上而从蛋白质中分离，但这样必须对柱子进行经常地原位清洁。另外一些情况下，也可以通过病毒和蛋白质以不同的速度通过柱子而进行分离。凝胶过滤提供了一种非常有效的病毒清除方法。

成功的病毒检测实验的主要问题是需要建立一个敏感的分析系统。目前许多分析只能检测某一种特异的病毒或者某一组相关的病毒，因此许多情况下只能针对原材料中最有可能出现的病毒来进行检测和分析。

有许多种检测方法可用，如使用病毒特异的 DNA 探针，常用于鉴定某些人类逆转录病毒如 HTLV-1 或 HTLV-2，其他的病毒诊断方法建立在免疫学基础上如酶联免疫吸附（enzyme-Linked immunosorbent assays，ELISA，第 9 章）。

一些体外的病毒检测包括将可能感染的样品和对一些人或鼠病毒敏感的检测细胞系孵育，过 14d 或更长时间后检测敏感细胞系相关的细胞病理变化，从而推测样品是否被感染。

也可以用某些鼠、兔或仓鼠抗体产生试验（MAP、RAP 或 HAP）来检测各种病毒的存在与否。其过程是用试验样品注射鼠、兔或仓鼠，4 周后收集血清，检测是否有识别某些病毒抗原的抗体出现。

必须通过大范围的验证实验来确保纯化过程中使用的蛋白质纯化方案能有效地灭活任何污染的病毒或将这些病毒从终产品中分离出去。通常是在要从其中纯化目标蛋白的原材料加入一定量的病毒颗粒，然后进行全程的纯化程序，这种纯化过程一般是缩小至实验室规模上进行的，在纯化过程的每一步后都要检测病毒的失活或清除情况，最后可算出病毒的减少因子。

通常，这些验证实验研究中要使用至少 3 种不同病毒的混合物，病毒种类的选择依据于许多因素，包括原材料中最有可能出现的病毒的情况，所选的病毒必须具有一些理化特性（大小和形态等），并且都应该易于检测。

尽管所使用的病毒数量会根据情况有所变化，但一般都会使用达 1×10^{10} 个的病毒颗粒。小规模纯化过程中累积病毒灭活或清除效果应达到 10^{16} 以上，这样，一次剂量的终产品中含有一个病毒颗粒的可能性应该不会超过百万分之一。

4.3.3　热原质污染物

热原质是另一类非肠道使用的产品中危险的污染物，它的存在是非常烦人的。热原质是一类影响下丘脑体温调控功能的物质，有多种化学物质和微粒物质可以是热原质。通过使用综合处理的原材料、处理过程进行严格的质量控制并且坚持很好的生产实践原则，可以避免终产品中此类物质的污染。大多数非经肠道使用的溶液在进入终产品容器时都要通过 0.45μm 或 0.22μm 滤膜的过滤，这样可以去除可能引发受体病人热原性反应的微粒物质。

但是，到目前为止最常见的污染产品的热原质是来源于细胞的内毒素。由于其广泛存在，控制它的污染相当困难。内毒素是来源于革兰阴性细菌细胞壁的脂多糖（Lipolysaccharide，LPS）物质，不像革兰阳性细菌的细胞壁是由厚厚的肽聚糖保护层组成，革兰阴性菌的细胞膜由包在外面的外膜和里面的一层肽聚糖层组成，外膜主要由磷酸酯、脂多糖和蛋白

质组成。脂多糖，即内毒素，由黏附于类脂 A（将此结构锚定于膜上）上的核心多糖及伸出膜表面的多糖 O 抗原组成。除含有半乳糖、葡萄糖和 *N*-乙酰氨基葡萄糖等己糖外，核心多糖还含有一些 7 碳糖（庚糖），*O*-侧链多糖除含有一些己糖如葡萄糖、半乳糖和甘露糖之外，还含有一些更为不常见的双去氧糖如阿比可糖和泊雷糖。脂结构不含有甘油，其脂肪酸是（通过脂键）直接连接到 *N*-乙酰氨基葡萄糖上。现在认为脂类成分是脂多糖分子主要的毒性成分，而多糖则减弱了其水溶性。但必须强调的是，并不是所有的革兰阴性菌的脂多糖分子都有毒性效应。革兰阴性菌的裂解可释放出自由的内毒素分子。下游处理过程中，革兰阴性菌的存在，尤其是其裂解可导致产品被大量的内毒素污染。

内毒素的一个在临床上最显著的反应是发热，即热原性反应。这种效果是间接的。内毒素作为一个潜在的刺激因子刺激巨噬细胞产生白介素 1（IL-1），白介素 1 也作为一种内源性的热原质，继而又引起发热反应。内毒素是这种刺激系统潜在的激活子，在败血性休克的产生中是必需的。尽管败血症通常是由于革兰阴性菌（血中含有革兰阴性菌）引起的高水平循环的内毒素引起的，但经注射获得的内毒素至少也会激发部分的败血性休克，这是一种非常危险的疾病，严重时可导致病人死亡（图 4.9）。

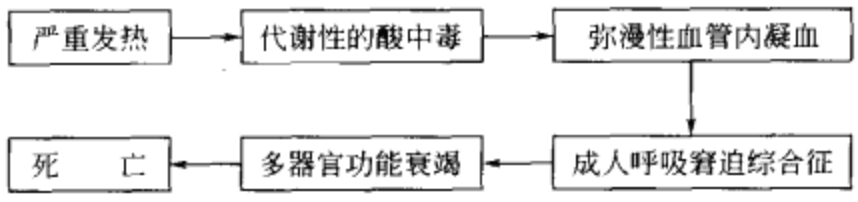


图 4.9　与败血症相关的临床症状

有多种方法可检测非经肠道使用的制剂中是否含有热原质。比较古老且最广泛使用的方法是兔试验，让兔非经肠道使用一部分产品，然后监测兔子的体温变化。这种方法能够检测多种热原性物质，但它也有许多局限性。整个实验过程劳动量较大、浪费空间和时间且需要操作实验动物的专业技术人员。所用兔子的情绪也会影响实验结果。大规模的兔实验中兔子之间的个体差异，同样可能会导致不同的评判标准。另一种体外检测方法是鲎内毒素刺激的变形细胞溶解物凝结试验。

20 世纪 50 年代中期以来，人们就知道革兰阴性菌感染可引起美洲鲎（*Limulus polyphemus*）凝血，该凝血因子存在于这种鲎的循环血细胞（称变形细胞）内，内毒素的存在可以激活这些凝结剂。科学研究已经发现内毒素激活的级联反应是一个并不像高等动物中一样的凝结级联系统，这种级联系统的激活不仅依赖于内毒素的存在，而且需要二价阳离子如镁或钙的存在。这种凝结级联系统（见图 4.10）的最后结果是将无活性的原酶经蛋白质降解而成为有活性的凝结酶，这种酶催化凝结蛋白（凝结原）的蛋白水解断裂从而形成凝固素和自由的 C 肽段，自由的凝固素分子通过非共价键相互作用从而导致凝结反应。

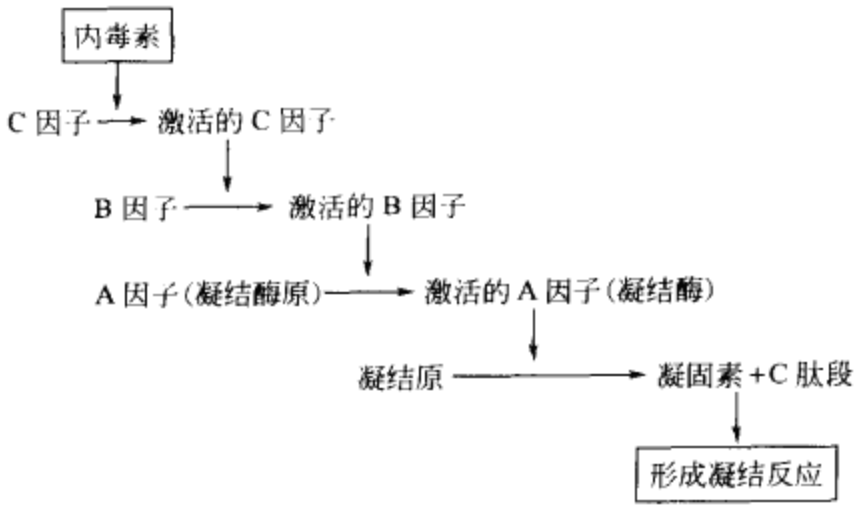


图 4.10

当血管暴露于内毒素时，鲎中发生内毒素介导的血管内凝结反应。鲎变形细胞溶解物包含了凝结系统的所有组分，当样品中含有内毒素时，将二者一起孵育会产生凝结反应

鲎变形细胞溶解物凝结试验（Lim-

ulus amoobocyte Lysate，LAL）就是建立在这种凝结系统的基础上，先提取和清洗鲎变形细胞，然后诱导胞内裂解。可利用市场上买到的鲎裂解物与试验样品在不含热原质的试管中孵育，通常需要1h。只要试验样品中含有内毒素，就会激活凝结系统，因而试管中就会出现凝结现象。

鲎变形细胞溶解物凝结试验（LAL）广泛用于非肠道使用制品中、大规模使用的试剂如WFI中以及生物液体如血清或脑脊液中内毒素的检测，其广泛使用说明了这种方法具有敏感、快速、特异性以及重复性较好的优点。在注射用水和非肠道使用制品溶液内毒素检测中，鲎变形细胞溶解物凝结试验（LAL）已经在很大程度上替代了兔发热实验，它可以检测每毫升被测样品中几皮克的内毒素，这种敏感性尚没有别的方法能够达到。但这种方法的高度特异性在某些情况下却是一个缺点，如它不能用来检测非内毒素的热原性物质。

对鲎变形细胞溶解物凝结试验（LAL）应用于各种生物制药过程中的可行性必须进行检验。尤其是被测样品中的任何组分都不能抑制凝胶的形成，这可以通过在被测样品中加入一定已知量的内毒素来解决，如果存在抑制物质，则会阻止凝结现象。鲎变形细胞溶解物凝结试验（LAL）可修改为一种显色的形式，这包括将被测样品与变形细胞溶解物及适当的显色底物共孵育，底物通常是连接了显色剂的一种短肽，内毒素激活凝结系统从而使底物降解释放出游离的生色团，与结合状态的生色团不同，游离的生色团可以吸收特定波长的可见光，这种波长下的吸收值反映了被测样品中内毒素的含量，因此这种方法是可定量的，显色反应很快，可在15min内形成。

处理设备或产品中的内毒素可用多种方法灭活或清除，但脂多糖（LPS）是热稳定的，热处理不易破坏。经干热（180℃下3h或240℃下1h）或温热（3次连续的高压灭菌）可去除热抗性的处理设备和鲎变形细胞溶解物凝结试验（LAL）中使用的试管上的热原质。

层析柱通常是通过在原位清洁过程中用NaOH溶液浸泡、用无热原质的水或缓冲液彻底清洗等方法来去除热原质，直至洗出液中不含热原质。下游处理过程中应该尽量减少与细菌污染物的接触，常采取以下措施：①确保所有相关的纯化程序是在经控制的环境条件（如清洁室）下进行；②与产品接触的所有设备须经过清洁和消毒，可能的话在操作之前还须进行灭菌；③防止下游处理各个阶段细菌的生长繁殖。如果目标蛋白是来源于革兰阴性菌，还必须特别小心内毒素的污染。

内毒素分子同大多数蛋白质在理化特性有很大的区别，这样，许多蛋白质分馏技术可以有效地从目标蛋白中分离出内毒素，因而在下游处理过程中增加一个专门去除内毒素的步骤是没必要的。如果实在需要，一般都是利用内毒素的电荷或者分子量特性将其特异的去除。虽然单个的脂多糖分子的分子质量不足20ku，但在液相条件下会聚合形成100～1000ku的大分子，所以如果目标蛋白的分子质量小于100ku，则通过凝胶过滤层析可以有效地将内毒素分子分离出去；相反，如果目标蛋白的分子质量大于100ku，则可在缓冲液中加入螯合剂如EDTA等，这样可以促使内毒素分子解聚成单体形式，这样凝胶过滤层析就可以将内毒素和目标蛋白分离开来。建立在这个基础上的分离也可以用适当孔径的超滤膜达到同样的效果。

脂多糖（LPS）带有很强的负电荷，因而大多数的离子交换步骤可以将内毒素从蛋白质中分离出去，也可以通过用表面带正电荷的滤膜过滤将大体积溶液如水溶液中的内毒素消除。当溶液中含有内毒素之外的其他带负电荷的重要的蛋白质时，这种去除热原质的方法就不太适合了。

4.3.4 DNA 污染物

非经肠道服用的产品中 DNA 污染物对人体的影响尚不太清楚。理论上来讲，如果污染的 DNA 进入受体细胞基因组的话，会引起严重的临床并发症，如胞内基因表达水平的变化或外源基因产物的表达。许多用来生产某些治疗性产品的细胞系（如杂交瘤、重组 CHO 和 BHK 细胞系）含有激活的癌基因。尽管认为非经肠道服用的产品中含有的裸 DNA 对健康的危害很小，但注射产品中可能存在的癌基因应该是不太合适的。

在许多情况下，没必要在下游处理过程中增加去除 DNA 的步骤。原细胞提取物中的核酸通常被内源性的核酸酶降解，但是必要的时候也可以加入外源核酸酶。核酸酶处理可导致核酸降解产生核苷酸，核苷酸与对应于完整基因的 DNA 片段相比其危害性小了许多。后续的许多蛋白纯化步骤可将核苷酸从含产品的部分中去除，也可加入带正电的多聚物如聚乙烯亚胺（见第 3 章）从溶液中将核酸分子沉淀出来。

由于 DNA 与蛋白质在理化性质上有很大的区别，许多层析步骤都可以有效地将二者分离。像内毒素一样，DNA 也带有很强的负电荷，因此离子交换步骤在从产品中去除 DNA 方面非常有效。DNA 污染程度通常用种属特异性的 DNA 杂交分析来评价，如果目标蛋白是从大肠杆菌中纯化的，则对大肠杆菌的总 DNA 进行放射性标记后作为探针来检测产品中大肠杆菌 DNA 的污染。

为了证明下游处理程序是否能将终产品中的 DNA 含量降低至一定的可接受的限度内，需要进行 DNA 含量分析实验。确定一个合适的上限是很难的，但是每个治疗剂量中含有达 10pg 的残余的 DNA 通常认为是安全的。

DNA 分析实验与病毒分析实验所用的方法非常相似，包括在原材料中加入一定量的 DNA，然后按照纯化方案进行小规模的纯化。每完成一个纯化步骤，都要监测 DNA 分布谱和目标蛋白的分离情况，这样就能算出一个 DNA 减少因子。分析实验中通常使用与目标蛋白同样来源的 DNA。可以对加入样品中的 DNA 进行放射性标记，从而可直接进行检测；反过来，如果不标记加入样品中的 DNA，则需要用标记的 DNA 探针去检测加了 DNA 的样品。对加入原始材料中的 DNA 数量一定要仔细考虑，因为过剩的 DNA 会可逆地影响纯化程序，如加入产品中的大量的外源 DNA 会结合到阳离子交换树脂上，从而明显地减小树脂与其他分子的结合能力。对于加入某种起始材料中的 DNA 分子的特性一定要多加考虑，因为其分子量变化幅度可能很大，因此当加入这种 DNA 进行 DNA 分析实验时一定要非常小心。

4.3.5 蛋白质污染物

下游处理方案中的大部分纯化步骤都是特意设计用来将不同的蛋白质分子彼此分开的，尽管有很多种分离方法可达到这种目的，但当要获取经济学上可行的产量时，获得某一种高纯度的蛋白质仍然是一个非常艰巨的任务。可能的蛋白质污染物的范围与蛋白质的来源、生产方法以及下游处理方案有关。

蛋白质本身的修饰产物也可以认为是一种杂质，所有的蛋白质都可能受到一些结构上的修饰，从而改变它们的生物活性或免疫学特性（见第 3 章）。

① 聚合；
② 甲硫氨酸的氧化；
③ 不正确的二硫键形成；
④ 内源或外源的蛋白质酶的蛋白质降解；
⑤ 翻译后修饰中产生的酶的改变（糖基化）。

许多情况下，下游处理过程中得到的这些被修饰的产品很难与其天然的分子分开。聚合的或降解很严重的以及糖基化很厉害的分子可通过凝胶过滤层析将其从天然产品中去除，氧化或脱氨基化的蛋白质可以通过离子交换层析或等电聚焦等技术分离出去。

蛋白质杂质的一个主要临床危害与它们的抗原性有关，一些蛋白质杂质还可能有对蛋白质产品或受体病人不利的生物学活性。可能发生的不利的免疫学反应不仅与产品或杂质的免疫原性有关，而且与其使用途径尤其是使用频率有关，杂质蛋白质还可能作为一种佐剂物质，继而进一步增加蛋白质的免疫原性。如果某种治疗性蛋白质产品只需使用一次的话，免疫并发症倒不是一个大问题，但如果必须给病人重复使用的话就很麻烦。

从使用方法来讲，所有经注射使用的蛋白质都不诱导免疫反应的危险，一些蛋白质疫苗或毒素就是专门用来诱导免疫反应的。许多有重要治疗意义的蛋白质是人源的，因此没有免疫原性，其他的一些蛋白质也常常与人的天然蛋白质有很高的结构同源性，如猪与人的只有一个氨基酸的区别，牛与人的胰岛素也只有三个氨基酸的区别，这样使用牛胰岛素，尤其是猪胰岛素一般不会诱导强烈的免疫学反应。

不同的蛋白质诱导免疫反应的能力本身也会存在一些差异，很难预知某一种蛋白质是否能诱导强烈的免疫学反应。但一般来讲，如果产品与人相应的蛋白质同源性越低，诱导强的免疫反应的可能性越大，同时，大的多肽或蛋白质以及经与人体内翻译后修饰有较大区别的修饰方式修饰的蛋白质也可能会诱导相对较强的免疫反应。

由于一些原因，在临床上，服用的蛋白质诱导产生免疫反应是很麻烦的（除非这种蛋白质产品本身就是作为免疫原来使用的）。当产品多次服用时，可能激发针对“外源”蛋白质的抗体。这些抗原特异性的抗体可以降低或中和产品的效力，这意味着新一代人对蛋白质药物产生了临床抗药性，因此，要达到一定的临床效应，必须增加蛋白质的使用量。抗体与治疗性蛋白质的结合也会改变剂量-药效曲线，刚开始时抗体与治疗性蛋白质的结合可降低产品的效力，而当它俩分离时又会造成血流中自由蛋白缓慢、持续的释放。治疗性蛋白质与抗体的结合也会影响产品的正常降解。许多激素如胰岛素是通过受体介导的内吞作用从循环系统中被清除的，抗体的结合会严重影响这种吸收机制。病人也会对特殊的产品或常驻于产品中的杂质产生过敏性反应，这些过敏或者超敏反应通常是由 IgE 抗体或 T 细胞介导的细胞毒性引起的。

从纯化的蛋白质产品中检测蛋白类杂质的各种方法在第 3 章已进行了总结。有时会被忽略的一点是，经修饰的目标蛋白或其他蛋白可能是完全无毒性的。许多人认为，微量蛋白质杂质不必加入专门的纯化步骤来去除之。因此，临床前或临床试验也许就是真正用来评价这些微量杂质的临床危害的唯一步骤了。

4.3.6　化学和非细胞污染物

在产品纯化的各个阶段经常会发现各种非细胞污染物。某些污染物如微量的脂或多糖，可能来自产品细胞，但大多数的非细胞污染物是外源的。表 4.3 列出了一些可能的外源污染

表 4.3 下游处理过程中可能引入产品中的非细胞污染物

缓冲液成分	清洁剂
消毒剂	乙醇
蛋白质降解抑制剂	稳定剂
盐	配体及其他层析降解产物
甘油	处理设备和管件中渗漏的化学和离子物质
抗泡剂	—

物。纯化程序本身在很大程度上决定了终产品中是否还会存在这些杂质，一些情况下，纯化初期引入的杂质可经后续的一步或多步纯化步骤去除，而另外一些情况下，杂质则可能与目标蛋白一样被共纯化出来，必须增加有效清除杂质的纯化步骤将其去除，确保终产品中不含潜在的毒素、致癌剂以及其他不安全的杂质是非常重要的。为减少或消除化学的或者其他物质在储存期间进入产品，要选择达到一定质量标准的终产品容器。

许多化学污染物（如缓冲液成分和配基）是低分子量的混合物，这时，可用凝胶过滤或超滤有效地将其清除。通常来讲，高分子量的污染物较难从产品中分离出去，只有对杂质和蛋白质产品的理化特性比较清楚时，才能选择一定的方法将杂质从蛋白质产品中去除。

一些情况下（尤其是可能存在的杂质有毒时），必须以纯化系统清除该种污染物的效果进行评价。最好的办法是在可能污染该杂质的纯化阶段的纯化样品中加入一定量的该杂质，然后进行后续的纯化，但这种情况必须有一种合适的方法能检测该污染物。

作为一项附加的安全措施，终产品通常需要进行“异常毒性实验”和“常规安全实验”。安全实验一般要求对至少 5 只健康小鼠静脉注射达 0.5ml 剂量的终产品，然后对其进行 48h 观察，老鼠不能表现出与可能的症状不同的其他不良症状。如果一只或多只被试动物死亡或发病，则需要做进一步分析，而且需要用更多的动物进行重复试验。安全性试验是用来检测与所用产品相关的任何与预期不同的或不利的生物学反应的。

4.4 终产品的标记与包装

在填充和密封入终容器之后，所有的蛋白质产品接下来都要进行标记和包装。这些操作通常是高度自动化的，不需要重大的技术投入。但是标记本身来讲是一个很关键的操作。错标仍然是产品投诉的一个主要的原因。产品标签上的信息应包括产品名称、产品浓度和效力、批号、生产日期、失效日期以及存储条件。产品中含有的防腐剂和赋形剂以及正确的产品使用方式也应详细地列出。

4.5 进一步的阅读材料

图书

Avis, K & Wu, V. (1998) *Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing and Preservation*. Interpharm Press, Chicago.

Butler, M. (1996) *Animal Cell Culture and Technology*. IRL Press, Oxford.

Desai, M. (2000) *Downstream Protein Processing Methods*. Humana Press, Totowa, NJ.

Doran, P. (1995) *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press.

El-Mansi, M. (1999) *Fermentation Microbiology and Biotechnology*. Taylor & Francis, London.

Freshney, R. (2000) *Animal Cell Culture*. Oxford University Press, Oxford.

Godfrey, T. (1996) *Industrial Enzymology*. MacMillan, Basingstoke.

Goldberg, E. (1995) *Handbook of Downstream Processing*. Blackie Academic and Professional, Glasgow.

Harrison, R. (1993) *Protein Purification Process Engineering*. Marcel Dekker, New York.

Shanbury, P. (1995) *Principles of Fermentation Technology*. Pergamon Press, Oxford.

Shuler, M. (2000) *Bioprocess Engineering*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Spier, R. (1994) *Animal Cell Biotechnology*. Academic Press, London.

Uhlig, H. (1998) *Industrial Enzymes and their Applications*. John Wiley & Sons, Chichester.

Walsh, G. (1998) *Biopharmaceuticals; Biochemistry and Biotechnology*. John Wiley & Sons, Chichester.

Wiseman, A. (1995) *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Ellis Horwood, Chichester.

论文

Helmrich, A. & Barnes, D. (1998) Animal cell culture equipment and techniques. *Methods Cell Biol.* **57**, 3－17.

Hjorth, R. (1997) Expanded bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments. *Trends Biotechnol.* **15**, 230－235.

Hu, W. -S. & Aunins, J. (1997) Large scale mammalian cell culture, *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 148－153.

Konrad, M. (1989) Immunogeneity of proteins administered to humans for therapeutic purposes. *Trends Biotechnol.* **7**, 175－178.

Middelberg, A. (1996) Large-scale recovery of recombinant protein inclusion bodies expressed in *E. coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6** (4), 225－231.

Narayanan, S. (1994) Preparative affinity chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A.* **658**, 237－258.

Rech, M. *et al*. (1991) Current trends in facilities and equipment for aseptic processing. *Pharm. Technol. Int.* **3**, 48－52.

Rhodes, M. & Birch, J. (1988) Large-scale production of proteins from mammalian cells. *Bio/Technology* **6**, 518－523.

Schugerl, K. (2000) Integrated processing of biotechnology products. *Biotechnol. adv.* **18** (7), 581－599.

Tai, J. & Liu, T. Y. (1977) Studies on *Limulus* amoebocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **252**, 2178－2181.

Thornton, R. M. (1990) Pharmaceutically sterile clean rooms. *Pharm. Technol. Int.* **2**, 26－29.

Varley, J. & Birch, J. (1999) Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnology*, **29** (3), 177－205.

(王军军　译　　袁静　校)

第5章

用于治疗的蛋白质——血液制品和疫苗

5.1 引　言

人血管系统包含5～6L血，这平均占整个体重的8.5%～9.0%。全血是由红细胞（占整个血细胞的99%）、白细胞和血小板组成，它们都悬浮在血浆中。血浆具有一种特有的浅黄色，主要是由于存在血红蛋白的降解产物胆红素，在将合适的抗凝剂加至刚抽出的新鲜血液后，通过离心便可获得血浆。加抗凝剂是为了在离心去除悬浮在血浆中的细胞时防止血液凝固，如果允许血液凝固，那么从血块中渗出的液体被称为血清。悬浮的细胞和血小板被诱捕或绊缠在一个由纤维蛋白组成的交联网络里便形成血块，纤维蛋白来自纤维蛋白原（一种血浆蛋白）。血浆与血清基本相同，但在血清里存在纤维蛋白原。

血液的各种成分有助于体内的各种生理功能，由于血管系统形成一个广泛网络，血液可以起运输作用，运送体内的各种物质，例如营养素、废物、气体、抗体、酶、非胃肠道给予的物质、激素和其他调节因子，血液也在其他生理过程中起重要作用，如维持组织水合作用水平和调节体温。

在血浆中发现的某些蛋白质还有血液的许多特殊功能，血浆蛋白的电泳分离显示有5种主要带：白蛋白、α_1-球蛋白、α_2-球蛋白、β-球蛋白和γ-球蛋白，血清白蛋白含量最丰富，占总血浆蛋白的50%以上，所有球蛋白包含各种不同的蛋白分子。

5.2 血液制品

5.2.1 全血和血浆

全血是通过无菌操作从供血者体内采集到的，为防止凝集，立即将它与抗凝剂混合，合适的抗凝剂包括肝素和柠檬酸钠，全血可用作各种血液成分的来源：

① 红细胞；

② 血小板；
③ 各种凝血因子；
④ 免疫球蛋白；
⑤ 其他血浆成分。

如果所需血液的特殊成分市场上可以买到，那么使用全血便是浪费。而且用于制备特殊的血制品的级分（fraction）方法大大地降低了从污染的血意外传染疾病的危险性。

必须对从供血者那里得到的血进行检测，看是否存在各种可能致病的污染物，特别是甲肝、乙肝和艾滋病毒。因此，通常对提供的血液样品分别检测乙肝表面抗原和抗-HIV 抗体。全血通常被给予严重失血患者，浓缩的红细胞级分（fraction）和低血浆血液在市场上也已有供应，可用于某些特殊的患者。

血浆是通过对全血进行离心后得到的，然后在通常情况下冷冻保藏至使用。当市场上没有纯化的但在治疗上重要的血浆蛋白出售时，血浆在临床上便作为重要血浆蛋白的来源，例如各种凝血因子。然而另一个被广泛应用的全血的衍生物被称作为血浆蛋白溶液或血浆蛋白级分，这种水溶液是通过对血浆或血清进行不彻底的级分后获得的，主要是由血清白蛋白组成，也有少量的球蛋白。血浆蛋白液在大量失血后引起休克的情况下使用，这种突然的失血可能是由于内部或外部出血、广泛的烧伤或失水。

5.2.2　源于血液的蛋白质

用于治疗的特殊的血液蛋白质包括一系列参与血液凝集过程的因子，降解血块的溶解纤维蛋白的因子、血清白蛋白和免疫球蛋白制品。除了全血和血浆制品外，大部分这种蛋白质很多年前市场上已有供应。尽管这些产品通常是从供者血液中获得的，但是现在有些是通过重组 DNA 技术生产出来的，后面将论述。

5.2.3　血液凝集因子——生物化学和功能

各种血浆蛋白是血液凝集过程不可缺少的部分，任何一个血液因子的缺陷，不管是遗传的还是诱变引起的，都会严重导致损伤血液凝集的能力，在医学上产生严重的后果。好多以凝血反应差为特征的遗传病是由于血液因子Ⅷ和Ⅸ缺陷。各种其他非遗传的临床条件如维生素 K 不足也会导致损伤血液凝固过程。

当血管被损伤或切开时，血液中的一些特殊成分开始止血过程——减少出血并最终停止出血。止血最终取决于两个相互依赖的生理过程：①血小板闩塞的形成；②血液凝集过程。止血的特征是血小板迅速黏附到损伤部位，血小板也彼此黏附，常用这种方法阻止血流。聚集在一起的血小板也分泌各种胺，如刺激血管局部收缩的肾上腺素，开始了血液凝集过程，导致在损伤部位形成血块（血栓）。

血液凝集过程依赖于许多有关的血液凝集因子，它们是被用罗马字母命名的，但各自也有一个普通的名称。表 5.1 列举了各种血液因子，除了因子Ⅵ（钙离子）以外，所有其他因子本质上都是蛋白质。

好多血液因子（例如因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ和Ⅻ）活化后有蛋白水解活性，没有被活化的因子是蛋白酶酶原。被激活的因子在凝血过程中催化另一个因子的蛋白水解作用，导致该因子被激

活。因此，凝血次序可以被看作为一个分子级联系统，凝血因子依次被激活，每一个被激活的分子反过来又能催化激活另一个因子的好多分子，这就导致了起始信号明显地被逐级放大。

表 5.1 中的蛋白质有的没有蛋白水解作用，但是那些没有水解作用的辅助因子（因子Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅷ）构成了凝血系统的基本成分，它们一般被蛋白水解因子之一激活，然后提高激活其他血液因子酶原的速率，一些从损伤组织或血小板释放出来的磷脂成分也可加快凝血速率。

表 5.1 血液凝集因子

凝血因子	名　称
因子Ⅰ	纤维蛋白原
因子Ⅱ	凝血酶原
因子Ⅲ	促凝血酶原激活(组织因子)
因子Ⅳ	钙
因子Ⅴ	易变因子(前加速因子,亦称促凝血球蛋白原)
因子Ⅵ①	
因子Ⅶ	前转化素
因子Ⅷ	抗血友病因子
因子Ⅸ	克里斯马斯因子(血浆促凝血酶原激酶成分)
因子Ⅹ	司徒因子
因子Ⅺ	血浆凝血致活酶前体
因子Ⅻ	海氏因子
因子XIII	纤维蛋白稳定因子

注：① 这个原来称为因子Ⅵ的蛋白质后来被归到因子Ⅴa，因此现在因子Ⅵ还没有被分配名称。
在上面的因子字母后面加上一个 a 表示它们是激活型，例如：因子Ⅶ的激活型是Ⅶa。

两个不同的血液凝集途径是：内源性途径和外源性途径。外源性途径依赖于通常存在于血浆中的因子，该途径起始于因子Ⅶ在与损伤表面接触后被活化。外源凝血途径除了需要血液因子外，还需要组织因子（因子Ⅲ）存在。组织因子加上钙离子（因子Ⅳ）、因子Ⅶ和磷脂大大促进因子Ⅹ的被激活。组织因子是存在于各种组织的一种辅助蛋白质，它除了在肺和脑存在外，在唾液中也特别多，它是一种不可缺少的膜糖蛋白。组织因子是在组织受损时与膜的磷脂成分一起释放出来的，因此它能在损伤部位起始一个外源性的血液凝固级联反应。如果凝血起始于这个途径，那么凝血过程进行得非常快。虽然这些途径的起始激活次序是不同的，但是凝血的结束次序两种情况是相同的（见图 5.1）。这些凝固级联反应的最后步骤（共有的步骤）包括凝血酶原（因子Ⅱ）转变成凝血酶（因子Ⅱa），该蛋白的分解反应是由激活的司徒因子（Ⅹa）催化的。

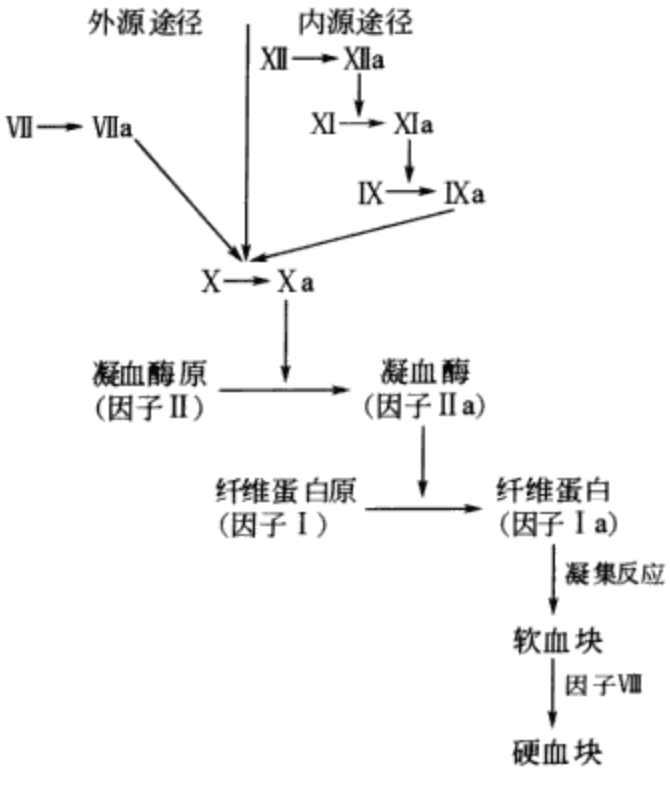


图 5.1 内源和外源血液凝集途径略图

凝血酶催化可溶性的纤维蛋白原断裂成为不可溶性的纤维蛋白，随后纤维蛋白单体相互作用形成纤维蛋白血块。开始的这种相互作用是非共价的，产生了一个大的凝聚的“软”血块，随后通过因子XIII（也叫纤维蛋白稳定因子，fibrin stabilizing factor，FSF）转变成硬血块。激活的因子XIII在一个纤维蛋白单体的赖氨酸残基和一个相邻的纤维蛋白分子的谷氨酰胺酰残基之间催化形成共价交叉连接，因子XIII本身是在有钙离子存在的情况下被凝血酶激活。

5.3　血友病 A 和血友病 B

引起任何一种血液因子产量降低或氨基酸序列改变的遗传缺陷可以导致严重的疾病，这种疾病的特征是凝血能力差，导致出血时间延长。除组织因子、钙和磷脂外，所有这种缺陷的 90%以上是与因子Ⅷ的缺陷有关。好多其余的情况是由于因子Ⅸ的缺陷。与因子Ⅷ或Ⅸ有关的临床疾病包括血友病 A、冯威勒布兰特病（von Willebrand's disease，vWD）和血友病 B。

复合物因子Ⅷ是由两个分离的基因产物组成的。一个比较小的多肽（170ku）显示了凝血剂的能力，常被称之为Ⅷ：C，该多肽是由因子Ⅷ基因编码。那个比较大的多肽命名为 von Willebrand 因子（Ⅷ：vWB），明显是与血小板的黏附有关系，它由 *vWB* 基因编码，合成后各个 von Willebrand 多肽聚集而成大的多肽聚体结构。因子Ⅷ基因的产物（Ⅷ：C 多肽）与多肽Ⅷ：vWB 连接在一起形成完整的复合结构（Ⅷ：C 和Ⅷ：vWB 可以从血浆一起被纯化）。完整结构的分子质量超过 1Mu，其中大约 15%是碳水化合物。

不能合成Ⅷ：C 导致经典的血友病（血友病 A），而不能合成Ⅷ：vWB 导致 von Willebrand 病。在患血友病 A 时，Ⅷ：vWB 通常是被合成的，但是 von Willebrand 病同时缺乏因子Ⅷ：C 和Ⅷ：vWB，患 von Willebrand 病患者实际上合成正常的Ⅷ：C，但很快被降解掉，因为只有当与Ⅷ：vWB 连结在一起时，Ⅷ：C 才能稳定（图 5.2）。血友病 B 也称 Christmas 病，是由因子Ⅸ缺陷引起的，它的临床结果与那些经典的血友病是相同的，但是它不像后者那样常发生（见信息框 5.1、图 5.3）。血友病临床症状的性质和严重性依赖于血浆中该因子的水平，因子Ⅷ：C 或因子Ⅸ的水平非常低（例如：小于正常水平的 1%）的病人可能经常自发性大出血。对于有活性的因子的水平较高（3%～5%或以上）的患者，其临床症状的严重性较低。

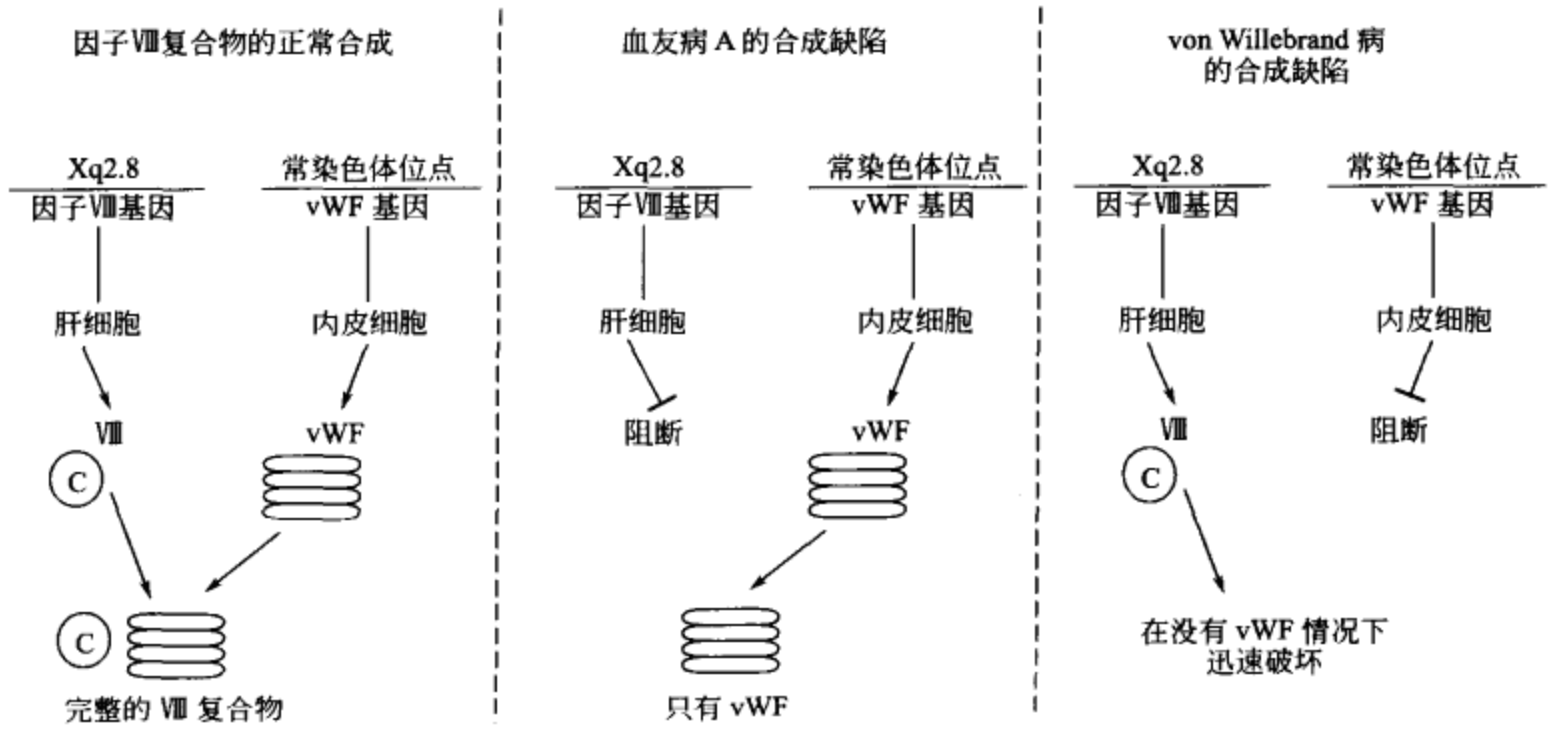


图 5.2　Ⅷ：C 和 vWF 因子的正常合成和在血友病 A 及 von Willebrand 病情况下的合成缺陷

由 Kumar，P. & Clark，M.（1990）Clinical Medicine，2nd edn，Baillière Tindall，London 许可复制

5.3.1　医用的凝血因子产品

治疗上述出血病通常是给予相应缺乏的因子，因子Ⅷ和Ⅸ通常是从健康人血浆中分离纯

化到的，当用传统的方法（主要是沉淀步骤）纯化时，因子Ⅸ中还包含一定量的因子Ⅱ、因子Ⅶ、因子Ⅹ和因子Ⅺ。因此该制品也可用于缺乏上述任何一种因子的病人。最近，源于血浆的因子Ⅷ通过用高分辨层析技术（包括免疫亲和层析）进一步纯化。不管用什么方法生产的，最终的产品经过滤消毒，装进容器并冷冻干燥。装有制剂的容器在真空条件下或在没有氧的氮气中密封，以便将氧化变质的可能性减到最少。在最终制品中通常也包含抗凝血剂肝素或柠檬酸钠，然而这些制品中不包含抗细菌因子或其他防腐剂。

在制备血制品时要用没有病毒污染的血浆的重要性没有被足够重视，估计有60%以上的血友病患者已被来源于血浆或血制品的病原体感染了。除了筛选血源以外，也可采用其他方法来降低感染因子偶然传播的可能性。这些方法包括在最终的制品中加入抗病毒物质或加热失活处理。与整个血浆相比，由于通过层析，纯化或部分纯化的制品污染潜在的病原体的可能性比较小。

5.3.2 重组血液因子

重组DNA技术加速了重组血液因子的生产，迄今为止，已有几种这样的产品获准允许在临床应用（表5.2）。重组产品可以克服由血液来源（采的血源不合格）可能产生的任何问题。重组产品的优点是消除了由血液来源传播疾病的危险。由于大多数血液因子显示出翻译后修饰（糖基化、蛋白水解过程和在某些情况下的γ-羧化作用），采用了真核表达系统。迄今批准的产品是在加工过的CHO细胞（例如：Benefix and RoFacto）或BHK细胞（例如：NovoSeven）中生产的，重组血制品也可以生产在转基因动物的奶中（见第2章），克隆的第一头羊（多利，Dolly）拥有人的因子Ⅸ。

表5.2 已批准用于临床的血液凝集因子

产　品	公　司	适　应　症	批准时间
Bioclate(在CHO细胞中生产的重组血液凝集因子Ⅷ)	Centeon	血友病A	1993(美国)
Benefix(在CHO细胞中生产的重组血液凝集因子Ⅸ)	Genetics Institute	血友病B	1997(美国,欧洲)
Kogenate(在BHK细胞中生产的重组血液凝集因子Ⅷ,同时也被Centeon作为Helixate销售的)	Bayer	血友病A	1993(美国)
NovoSeven(在BHK细胞中生产的血液凝集因子Ⅶa)	Novo-Nordisk	某些形式的血友病	1995(欧洲) 1999(美国)
Recombinate(在一种动物细胞系生产的血液凝集因子Ⅷ)	Baxter Healthcare/ Genetics Institute	血友病A	1992(美国)
ReFacto(Moroctocog-alfa,即在CHO细胞中生产的B区域缺失的重组血液凝集因子Ⅷ)	Genetics Institute	血友病A	1999(欧洲) 2000(美国)

注：大部分产品允许在世界的几个地区使用。

为了获得纯的产品，在从生产过程中获得最初回收的重组血液因子后，还需要经历一系列的纯化步骤，市售的都是冻干制品。其中一个这种产品（Benefix）的生产概况参见信息框5.1。

5.3.3 非遗传的凝固疾病

不是所有的血液凝固疾病都是由凝血因子的遗传缺陷所引起的，许多这种获得性凝血疾病是由肝功能和/或维生素K缺乏引起的。好多血液因子（如纤维蛋白原、凝血酶原和因子Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ）都是在肝内合成的（图5.3）。维生素K是一种羧化酶不可缺少的辅助因子，这种酶借助于因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ和Ⅹ催化一些谷氨酸残基γ-羧化作用，如图5.4。如果这些因子成功地结合钙离子，依赖维生素K的翻译后修饰必定发生。

信息框 5.1　实例研究——生产重组凝血因子Ⅸ（Benefix）

因子Ⅸ基因突变明显降低有生物活性的因子Ⅸ蛋白的表达，这就导致了血友病 B 的发生。这种情况几乎只发生在男性，因为因子Ⅸ的基因位于 X 染色体上，其发病率为每出生 2.5 万～3 万个男孩中就有 1 个。因子Ⅸ是单链、由 415 个氨基酸组成、分子质量为 55ku 的糖蛋白，由 5 个结构域组成［一个“γ-羧基谷氨酸”（Gla）域，两个“表皮生长因子样”域，一个“激活肽”（AP）域和一个“丝氨酸蛋白酶”域］。成熟的肽发生了多个翻译后修饰，Gla 结构域有 12 个 γ-羧基谷氨酸组成，该蛋白质也有总共 7 个潜在的糖基化位点。因子Ⅸ是一种酶原，在体内通过在两个位点的（Arg145 和 Arg180）蛋白质水解断裂转变成有活性的酶。这种蛋白质水解断裂产生了有活性的因子Ⅸ（Ⅸa），它是通过一个二硫键和一个 35 残基的肽结合在一起的异源二聚体。

Benefix 是由 Genetics Institute（Cambridge，MA，USA）开发的重组因子Ⅸ产品。该产品是用包含编码这种人类蛋白的核酸序列的表达载体的 CHO 细胞生产的。简单地说，生产过程包括在一个 2500L 的生物反应器中培养 CHO 细胞 3d（直到获得高的细胞密度），然后通过微量过滤被从培养介质中除去完整的细胞，接着对介质进行超滤（浓缩），再进行渗滤（以确保产品存在于合适的加工缓冲液中）。最后通过 4 个连续的层析步骤，获得了高分辨率的纯化：离子交换（Q Sepharose），用 Matrex cellufine sulfate（肝素类似物，用于亲和纯化具有肝素结合区的蛋白质，由于带负电的硫酸盐基团，所以也起部分离子变换作用）进行亲和层析、羟基磷灰石层析，最后用铜（Ⅱ）作为固定化金属离子进行固定化金属亲和层析。

用一个截止点为 70ku 的膜滤器进行纳滤，采用这一步骤的目的是增加一个病毒安全层，55ku 的该产品能通过膜，存在于产品中的任何病毒被截留在膜上，最后采用超滤-渗滤步骤是为了浓缩纯化的产品和实现缓冲液的更换（即把产品置于最终的配方缓冲液中），然后进行冷冻干燥。该配方缓冲液包含如下赋形剂：组氨酸（作为缓冲液）、聚山梨酯-80（在冻干时保护产品免受损坏）、蔗糖（稳定和保护在冷冻状态下的产品）和甘氨酸（帮助生产高质量的冷冻干燥块状物），最终产品在 2～8℃的保存期为至少 2 年。

最终产品的纯度用 SDS-PAGE、大小排阻 HPLC、反相 HPLC 和 N 端测序进行评价。产品的同一性通过生物试验、电泳迁移程度、肽作图、碳水化合物指纹分析和测定该分子 Gla 含量来证实，用因子Ⅸ缺乏的血浆进行的凝血试验来测定最终产物的效力，每个产品在上市前总共要做 150 多次试验。

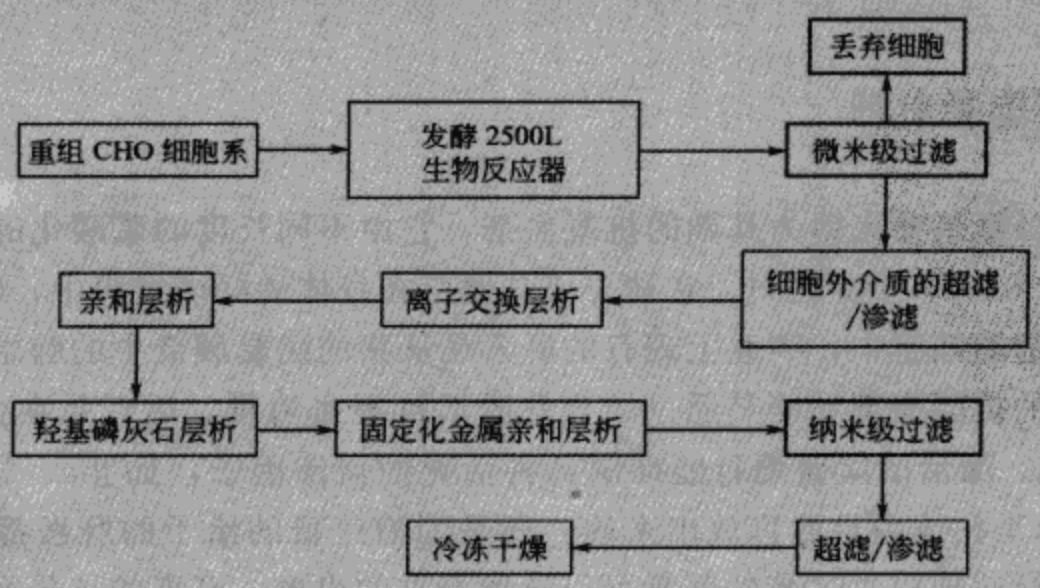


图 5.3

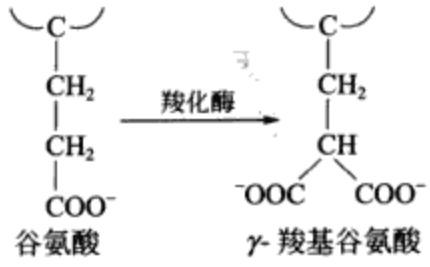


图 5.4　由维生素 K 依赖的羧化酶催化的反应
详细描述请参考正文

5.4　抗凝血剂

抗凝血剂的功能是防止血液凝固，在临床上用于易形成血块的高危病人，同时也用来防止血块进一步形成。因此，抗凝血剂常用于心脏病、中风或深度静脉血栓形成的患者，尽量防止复发。

血栓形成指的是形成血块，血块本身称为血栓，在有病的血管内血栓非常容易发生。在动脉中形成的血栓阻碍血液流至组织，在冠状动脉中形成的血栓（冠状血栓形成）会阻止血液流至心肌，这就导致患心脏病，结果引起死亡或部分心肌梗死——即心梗，阻挠血液流至脑组织的血栓通常会引起中风，而且在血栓形成后，血栓或血栓的一部分会分离开，在血液中流动，停留在另外的血管中，又在那里阻碍血液流动，这种过程称作为栓塞，同样可以引起心脏病或中风。深度静脉血栓形成指的是在腿部的深静脉内形成血栓，这能在正常的、明显是健康的静脉中发生，危险因素包括外科、不动、高龄和怀孕，深度静脉血栓倾向于形成栓塞。一些有治疗价值的抗凝血剂列于表 5.3。

表 5.3　一些在治疗上使用的抗凝血剂

抗凝血剂	结　构
肝素	氨基葡聚糖
双香豆素	以香豆素为基础的维生素 K 的抗代谢产物
华法林	以香豆素为基础的维生素 K 的抗代谢产物
安克洛酶	丝氨酸蛋白酶
水蛭素	能结合并失活凝血酶的多肽

5.4.1　传统的抗凝血剂

肝素是一种以氨基葡聚糖为基础的抗凝血剂，它由不同长度的硫酸化的多糖链组成，分子质量范围在 6000～30000u 之间。它被合成并储存在身体的好多组织中，特别是在肺、肝、肠细胞和血管内壁的细胞中，商业上现有的肝素是从猪的肠黏膜或牛的肺中提取得来的。氨基葡聚糖发挥它的抗凝血剂功能是通过结合并激活抗凝血酶Ⅲ，后者是在血浆中被发现的，分子质量为 60ku。激活的凝血酶Ⅲ能抑制各种活化的血液因子，如Ⅱa、Ⅸa、Ⅹa、Ⅺa 和Ⅻa。因此，无论是在体内自然释放出来的、还是因治疗目的给予的肝素都抑制了血液凝集的级联反应，不合适地提供过量的肝素可以导致严重的出血。肝素的抗凝血剂活性是与多糖分子的分子量相关，这促使发展低分子量的肝素，它既具有抗凝血剂活性、又显示出降低了

出血作用。

双香豆素和华法林是以香豆素为基础的抗凝血剂，二者都可以口服。正是以前简述过的，这些维生素 K 抗代谢产物通过抑制抗凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ和Ⅹ的维生素 K 依赖的 γ-羧化作用来发挥它们的抗凝血因子作用，如果这些凝血因子与在正常凝血过程一样与钙离子结合，那么它们的 γ-羧化作用是必需的。使用双香豆素或华法林的副作用是可能引起严重出血。致死剂量的华法林是在好多鼠药中用作有效成分。

5.4.2　水蛭素

水蛭的颊分泌物包含一种称之为水蛭素的抗凝血剂。存在水蛭唾液内的一些成分不参与消化过程，但是能抑制宿主动物的止血机制，被水蛭咬了能延长出血至几个小时。

几个世纪以来，水蛭在医学上被用来促进血液流出以及局部抗凝血剂活性需要。的确，水蛭在医药方面正再度受到关注，它有时被用于从炎症部位去除血和被用在整形外科手术过程中。

水蛭的唾液中包含各种低分子量的肽，水蛭素是存在于欧洲水蛭（*Hirudo medicinalis*）唾液中主要的抗凝血剂。在 19 世纪 80 年代水蛭素首次被报道，尽管直到 20 世纪 50 年代才对它的特性作了鉴定，20 世纪 80 年代中期，水蛭素的基因被克隆了，后来被表达在各种不同的宿主系统。该多肽由 65 个氨基酸组成，分子质量为 7ku，在 63 位包含一个硫酸化的酪氨酸残基，在 C 末端有高含量的酸性氨基酸，其整个分子结构由被 3 个分子内二硫键稳定的 1 个球状区和 1 个延伸的 C 末端区组成。

水蛭素的抗凝血剂活性是由于它能牢固结合凝血酶因子Ⅱa，这导致凝血酶分子失活。凝血酶不仅催化纤维蛋白原水解成纤维蛋白，从而促进血块形成，而且在激活因子Ⅴ、Ⅷ和Ⅻ中起作用。水蛭素结合至凝血酶掩蔽了两个凝血酶的纤维蛋白原结合位点和它的催化位点，尽管水蛭素的天然抗凝血剂活性已经被认识，但是由于不知道合适的用量，导致在临床上不符合实际的广泛应用。与其他抗凝血剂相比，水蛭素看来有很多优点：

① 水蛭素直接与凝血酶作用；

② 水蛭素发挥抑制功能，不需要辅助因子；

③ 高剂量不太可能促进出血；

④ 免疫原性特别弱。

在过去的许多年里，市场上已有重组水蛭素出售，两个以水蛭素为基础的产品（商业名称为 Revasc 和 Refludan）现在也被批准应用于临床。两者都是用转化了带有编码水蛭素基因的表达质粒的酿酒酵母菌生产的，产品是被酵母菌分泌至发酵介质，然后被回收纯化，两者都具有与天然水蛭素相同的生物学活性，它们的结构与天然分子的差别仅在 63 位酪氨酸上缺失一个硫酸盐基团（sulfate group）。

在几种水蛭的唾液中包含与水蛭素不同的其他有抗凝血剂活性的多肽，其中之一是从水蛭衍生的重组蛋白酶抑制剂，它的分子质量大约是 15ku，通过抑制因子Ⅹa 发挥抗凝血剂作用。目前正在对该蛋白质进行研究，因为它还有抗肿瘤活性。在多种水蛭中获得的许多其他蛋白质也可能有潜在的临床意义，特别的例子包括失去稳定的酶（destabilase），它是催化纤维蛋白块去多聚作用的；另一种是抗栓肽（decorsin，可能拼写有误——译者注），它通过与血小板表面糖蛋白相互作用来抑制血小板凝集。

5.4.3 安克洛

安克洛是一种具有抗凝血剂活性的丝氨酸蛋白酶，这种酶是高度糖基化的，分子质量大约为 35ku，它是被从马来西亚尖吻腹蛇（the Malaysian pit-viper）的毒液中纯化到的。在血块形成以前，它催化微粒纤维蛋白分子水解断裂，但是，一旦血块形成了，这种酶对血块不起作用，它的作用正在临床试验中被继续评价。

5.5 血栓溶解剂

组织纤维蛋白溶解酶原激活剂、尿激酶和链激酶是治疗上用作血栓溶解剂。正因为如此，它们被用来治疗心肌梗死、栓塞、中风和深度静脉血栓形成。这些产品是在血栓形成后较短的时间内使用，然后紧接着在一段较长的时间内使用一种合适的抗凝血剂，全世界使用血栓溶解剂的人数每年超过 60 万人。

5.5.1 纤维蛋白溶解系统

纤维蛋白溶解是伤口自然治愈过程的一部分（图 5.5），这一过程涉及酶促降解和从循环系统中去除血块，该过程主要受丝氨酸蛋白酶中的一种纤维蛋白溶酶的调节。纤维蛋白溶酶催化酶促降解血块内的纤维蛋白链，纤维蛋白溶酶来自纤维蛋白溶酶原——它的循环酶原，人的纤维蛋白溶解酶原是一种在肾内合成的分子质量为 90ku 的糖蛋白。纤维蛋白溶解酶原由一条多肽链组成，包含许多链内二硫键，两种成熟的纤维蛋白溶解酶原存在的二硫键是相同的。

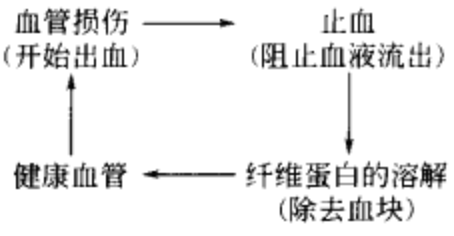


图 5.5 伤口治愈的简图

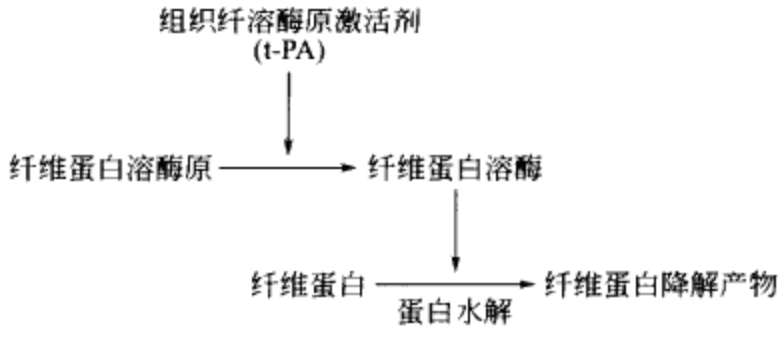


图 5.6 纤维蛋白水解系统

显示了组织纤溶酶原激活剂（t-PA）的作用，其他纤维蛋白溶酶原激活剂包括尿激酶、血管舒缓素和细菌链激酶

纤维蛋白溶酶原可被各种特异的丝氨酸蛋白酶激活，产生有活性的纤维蛋白溶解，组织纤溶酶原激活剂（t-PA）代表了纤维蛋白溶酶原最重要的生理激活剂（图 5.6）。t-PA 也称纤维蛋白激酶，由 527 个氨基酸组成的糖蛋白，分子质量为 70ku，具有丝氨酸蛋白酶活性，它通过断裂一个 Arg-Val 键而激活纤维蛋白溶酶原。血浆中发现的 t-PA 主要在血管内皮形成的，可以纯化到二种形式的 t-PA。Ⅰ型 t-PA 是一条链的多肽，而Ⅱ型 t-PA 是由经二硫键连接的二条多肽键组成，Ⅱ型 t-PA 是通过蛋白水解Ⅰ型 t-PA 而得。

纤维蛋白包含纤维蛋白溶酶原和 t-PA 的结合位点，纤维蛋白溶酶原被 t-PA 激活，形

成纤维蛋白溶酶，因此最有效地发生在血块表面。在血液中发现的游离的被激活的纤维蛋白很快会被另一个称之为 α_2-抗纤维蛋白溶酶的血浆蛋白失活，该糖蛋白在纤维蛋白溶酶的活性方面起重要作用。

5.5.2　以组织纤溶酶原激活剂为基础的产品

借助于重组 DNA 方法制备的重组人 t-PA 制品从 20 世纪 80 年代后期就上市了（表 5.4），尽管这些制品的效果是肯定的，但是价格昂贵，特别是与链激酶相比（后面将讨论）。

表 5.4　已获准临床应用的以重组 t-PA 为基础的产品

产　品	公　司	适 应 证	批准日期
Activase(组织纤溶酶原激活剂，在 CHO 细胞生产的 *rh-t-PA*)	Genentech	急性心肌梗死	1987 年(美国)
Ecokinase(Reteplase，rt-PA；与人 t-PA 不同，5 个结构域中有 3 个已缺失，产自 *E. coli*)	Galenus Mannheim	急性心肌梗死	1996 年(欧洲)
Retavase(Reteplase，rt-PA，见 Ecokinase)	Boehringer Manheim/Centocor	急性心肌梗死	1996 年(美国)
Rapilysin(Reteplase，rt-PA；见 Ecokinase)	Boehringer Mannheim	急性心肌梗死	1996 年(欧洲)

注：大部分已允许在世界几个地区使用。

Activase（组织纤溶酶原激活剂）是于 1987 年被批准用于临床的第一个重组 t-PA 产品，它是用包含编码天然人 t-PA 基因的工程细胞株 CHO 生产的。表 5.4 中的其他产品也都是 t-PA 的基因工程产品，但是 t-PA 的 5 个自然结构域中的 3 个已被除去，结果只剩 355 个氨基酸，只包含 t-PA 催化结构域和 Kringle 2 结构域（后者参与纤维蛋白结合的选择性）。这些 t-PA 的基因工程产品都是用重组大肠杆菌生产的，都以包含体的形式存在，因此下游加工包括匀浆后的变性和再折叠步骤（图 5.7），因为大肠杆菌不能进行翻译后的修饰，产品没有被糖基化。尽管 t-PA 的天然产品和基因工程产品的分子量是不同的，但是它们作为溶栓剂都具有相同的效果。

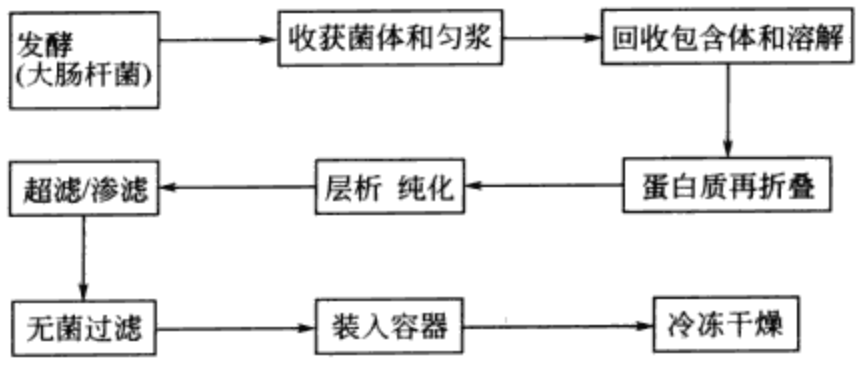


图 5.7　在重组大肠杆菌中生产一个经修饰的 t-PA（Rapilysim）的流程

还有几个不同的 t-PA 制品目前正在开发或临床试验中，目前重组 t-PA 已被生产在转基因动物的牛奶中（见第 2 章）。在转基因动物中生产的这种酶主要是双链形式，可采用下面的方法对该蛋白质进行纯化：用酸进行分馏、疏水相互作用层析和免疫亲和层析。正如预料的那样，该产品糖基化形式与用常规的 CHO 细胞生产的有点不同。

5.5.3　其他血栓溶解剂

其他血栓溶解剂包括尿激酶、链激酶和葡萄球菌激酶。尿激酶是由肾产生的丝氨酸蛋白酶，它也激活纤维蛋白溶酶原形成纤维蛋白溶酶，尿激酶是作为其前体形式产生出来的，是

在血浆和尿中被发现的，已有两种形式的尿激酶被纯化了，高分子量尿激酶的分子质量为54ku，而分子质量低的尿激酶大约是30ku。两种形式的尿激酶显示出类似的生物学活性，低分子量的尿激酶由高分子量的尿激酶水解而成。尿激酶可以用各种技术从人的尿中纯化，采用的层析步骤包括：亲和层析和凝胶过滤。但是治疗用的尿激酶通常用死亡新生儿肾细胞的原代细胞培养物制备。

细菌的链激酶也可用于激活纤维蛋白溶酶原，链激酶由各种溶血链球菌产生，通常可以从它们的培养过滤液中纯化到。经纯化后该蛋白质的分子质量在45ku的范围，由于它来自微生物，所以链激酶有免疫原性，它的使用有时会导致不利的过敏反应，但是它比其他血栓溶解剂特别是t-PA便宜。

与已经讨论过的纤维蛋白溶酶原激活剂不同，链激酶缺乏蛋白水解活性，该蛋白质紧密结合至纤维蛋白溶酶原，导致纤维蛋白溶酶原分子的构象发生改变，使其有蛋白水解活性。被激活的这对纤维蛋白溶酶原分子具备了催化蛋白水解激活其他纤维蛋白溶酶原的能力，因而产生有活性的纤维蛋白溶酶。

葡萄球菌激酶是由金黄色葡萄球菌产生的一种由136个氨基酸组成的酸性蛋白质，它具有溶解血栓的活性，因此目前正在进行临床试验，对它的作用进行评价。葡激酶的基因已被克隆并在重组大肠杆菌中获得表达，其三级结构也已被阐明。葡激酶的激活机制很大程度上与链激酶相同，它结合到纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶形成一个1∶1的整比复合物，该化合物然后能激活其他的纤维蛋白溶酶原分子。但是，与链激酶不同，与在血浆中游离的纤维蛋白溶酶原反应很差，但与存在于血块表面痕量的纤维蛋白溶酶具有很高的亲和力。最终形成的葡激酶/纤维蛋白溶酶复合物因此能激活存在在血块表面的其他纤维蛋白溶酶原分子。

5.6 其他血液相关制剂

除了参与血块或促进溶解血块的蛋白质以外，其他的几个血清蛋白实际上有重要的或可能的治疗价值，例如：人的血清蛋白、α_1-抗胰蛋白酶、血红蛋白和免疫球蛋白。

5.6.1 人血清白蛋白

血清白蛋白组成了血清中最丰富的蛋白质，大约占总血浆蛋白的60%，它也是已知的最小的血浆蛋白之一，分子质量为69ku，它也是少数缺乏碳水化合物部分的血浆蛋白之一，它在肝内被合成是作为前白蛋白原，在通过内质网时从氨基末端除去了几个氨基酸残基，产生了由585个氨基酸组成的成熟的白蛋白，这种成熟的白蛋白分子有几个链内二硫键，它由3个类似的结构域（Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ）组成，结构中有67%的α螺旋。

白蛋白的主要功能是提供血浆的大部分自然渗透压，它也起重要的运输作用，特别重要的是运输体内水介质中的少量可溶性物质，好多游离的脂肪酸牢固地结合到白蛋白，在血浆内用这种方式被运输。

在健康人体的尿中，几乎没有白蛋白存在，但是有些病人，特别是肾病患者，分泌大量血清白蛋白到尿中。某些肝病也导致肝的蛋白质合成明显降低，结果几个血浆蛋白的浓度明

显降低，降得最明显的是白蛋白。

人血清白蛋白的水溶液可以购买到，其浓度从5%～25%，人血清白蛋白制品用于某些形式的肾病或肝病患者，对于因血液体积减少而导致休克的病人，也可用它作为血浆体积扩充剂。血液体积的降低常与外科手术相联系，或发生在严重损伤以后。

白蛋白通常从健康供者的血清、血浆或胎盘中纯化而得，在纯化前，对所有还未加工的材料进行筛选，去除存在的病毒或其他可能致病的微生物，通过沉淀和层析的纯化方法，获得产品的纯度达到95%～96%。与大多数蛋白质水溶液制品一样，纯化的白蛋白经过滤消毒，然后无菌操作装填至消毒的容器，虽然没有加保护剂，但是最终产品中包含稳定剂辛酸钠，它对热有特别的抵抗能力。在装填产品后，对产品进行加热处理，使可能存在的致病微生物失活，通常60℃加热10h。

虽然目前商业上出售的白蛋白是从血或胎盘获得的，但是它已被用许多重组系统生产出来。采用的重组系统包括细菌诸如枯草杆菌和大肠杆菌、酵母菌（如酿酒酵母）和植物马铃薯。虽然白蛋白能便宜地从自然资源中直接提取，但是因为被感染过的产品会偶然传播血液携带的疾病，所以有必要生产这种蛋白质的重组形式。人血清白蛋白有时也在生物药品中用作稳定的赋形剂。

5.6.2　α_1-抗胰蛋白酶

α_1-抗胰蛋白酶是一个分子质量为52ku的糖蛋白，由394个氨基酸残基组成，包括3个糖基化位点。α_1-抗胰蛋白酶基因（*PI*）位于14号染色体远侧长臂，α_1-抗胰蛋白酶在肝内合成，在将血清进行电泳时α_1-抗胰蛋白酶的带占90%以上，它通常存在于血清中，每升达2g。该蛋白质的各种遗传性变型也已被叙述了。

α_1-抗胰蛋白酶是存在于哺乳动物血清中的主要丝氨酸蛋白抑制剂，它作为弹性蛋白酶的潜在的抑制剂，通过中性粒细胞的弹性蛋白防止肺细胞损害。中性粒细胞是粒细胞（特别是一类白细胞）的一种特殊类型。遗传缺陷导致人血浆中α_1-抗胰蛋白酶缺乏已经叙述过了，这种遗传缺陷主要在北欧血统的人群中流行，有这种遗传缺陷的人病情常发展成为对生命有危险的肺气肿，这是由于没有抑制中性粒细胞弹性蛋白酶对肺组织的伤害。通过静脉注入α_1-抗胰蛋白酶的替代治疗可以阻止这种疾病的进展。

治疗先天性α_1-抗胰蛋白酶缺陷的患者用的α_1-抗胰蛋白酶制品，通常是从收集的血浆中提取出来的，需要大量抑制剂（每个病人每年大约200g）和被感染过的原材料传播疾病的可能性促使重组α_1-抗胰蛋白酶的发展。α_1-抗胰蛋白酶最近被成功地表达在转基因鼠和羊的乳汁中。

5.6.3　血液代用品

在过去的几年里，关于发展血液代用品或者红细胞代用品已做了大量的工作，发展这种代用品会降低或消除血液制品会传播疾病的忧虑。人们希望这种代用品的保存期要比血细胞制品长，后者必须在收集的42d内使用，而且决定血型的抗原位于红细胞的表面，无细胞代用品可以不考虑血型而普遍应用。红细胞浓缩物目前临床上用于治疗一些形式的贫血症和溶血疾病。

好多物质被研究用作可能的血液代用品，用氟处理过的碳氢化合物（氟化碳）作为血液代用品也已作了评价，已在临床上用于少量的病人。这种氟化碳能成功运输氧气和二氧化碳，在一些动物模型中可以用来代替全血。如果这些化合物结合和运输临床上重要的氧，就需要吸高浓度的氧，而且一些临床研究指出，氟化碳可以导致妥协的免疫功能。这样的缺点妨碍它作为合适的代用品的广泛应用。

纯化的血红蛋白也已被研究作为潜在的红细胞代用品，血红蛋白是在循环红血细胞或红细胞中发现的主要蛋白质，它是四聚体，有两个不同的多肽链 α 和 β 组成。天然的分子可以用 $\alpha_2\beta_2$ 表示，总的分子质量大约为 64ku。4 个多肽亚基中的每一个也包含一个血红素的辅基，赋予这些多肽结合氧的性质（图 5.8）。结合一个氧分子到一个血红素基团，大大增加对剩余基团的氧的亲和力。

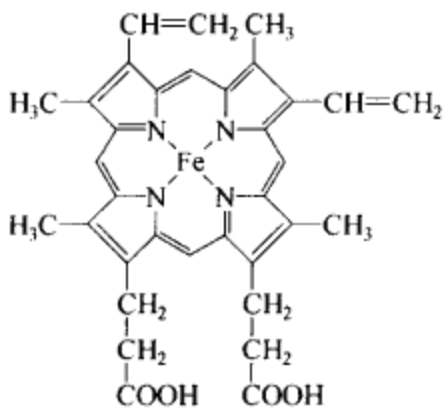


图 5.8 血红素辅基的化学结构

血红素基团不仅存在于血红蛋白，也存在于肌红蛋白和各种其他的血红素蛋白中

这种氧结合动力学使血红蛋白理想地适合于它的运输氧的作用，但是，血红蛋白分子本身作为血液代用品是不合适的，由于：①该蛋白质在红血细胞外的环境是不稳定的；②对氧的高亲和力。此外，当血红蛋白分子游离在溶液中时，很快分解成 αβ 二聚体，这种二聚体被迅速地从循环系统中除去。正常人的红细胞也包含大量 2,3-二磷酸甘油酸盐，结合 2,3-二磷酸甘油酸盐至血红蛋白降低了蛋白质对氧的亲和力，这促使在到达了需要氧的组织以后，释放结合的氧。缺乏 2,3-二磷酸甘油酸盐，使纯化的血红蛋白制品的氧亲和力太大，以至于不允许用这种方式有效地释放氧。

与游离血红蛋白的稳定性和它对氧的高亲和力相关的许多问题至少部分可以通过化学修饰加以克服，用戊二醛和其他促进多聚作用的因子处理会防止这种四聚体分子的分解。吡哆醛 5′磷酸基团的共价附着降低对氧的亲和力，在亚基之间引进特殊的交叉连接既可稳定血红蛋白单个的分子，也可降低它对氧的亲和力。所有这些修饰过的血红蛋白分子可以被描述为以血红蛋白为基础的氧载体（haemoglobin-based oxygen carriers，HBOC）。

大量的这种 HBOC 制品是从过了使用期的人血中纯化的血红蛋白衍生物而来。人们已经用牛血红蛋白进行了一些研究，牛血红蛋白与人血红蛋白相比对氧的亲和力较低，但是给予这种非自身蛋白会导致免疫学反应或过敏性反应。关于这一点，猪的血红蛋白是有意义的，因为它比较接近人血红蛋白分子。

与好多其他临床上有意义的蛋白质一样，血红蛋白也已被用重组方法制备了。血红蛋白的 α 基因和 β 基因可以被表达在个别的系统中，可以用纯化的重组产品重新组成完整的血红蛋白，或者两个基因可以在一个宿主中表达，这通常导致自动产生成熟的四聚体血红蛋白分子。血红蛋白已被成功地生产于重组大肠杆菌和酵母中，也已被生产在转基因动物的血液中。

虽然在技术上生产重组人血红蛋白是可行的，但是从过期的人血中抽提仍然是血红蛋白的主要来源，这仍然是生产血红蛋白最经济的方法。重组血红蛋白中存在的污染蛋白质本质上是非人的，因此是有免疫原性的。当从人血中提取血红蛋白时，就不存在这个问题，但是重组 DNA 技术允许研究人员合理地发展和表达具有预期特征（改进了稳定性或降低氧亲和力）的基因工程血红蛋白。关于这方面的研究正在进行。

5.7　疫苗技术

5.7.1　传统疫苗

如果将一个抗原，无论是自然地、还是人为地导入血流，那么宿主的免疫系统会引起免疫反应，该免疫反应包括产生一种能识别抗原并与之结合的特异抗体。抗体是由白细胞的一个亚群B淋巴细胞产生的，抗体与抗原结合可使抗原失活或中和，给抗原一个标记以便被免疫系统的其他成分破坏掉。此外，第二类白细胞T淋巴细胞可以被激活，激活的T淋巴细胞也可以引起免疫反应，这种细胞在破坏外源抗原诸如细菌和一些病毒中起重要作用。在免疫系统已战胜了外来的抗原后，被称作记忆细胞的长寿命B细胞和T细胞仍然保留在血液中，这些记忆细胞能识别曾经引起机体产生过免疫反应的抗原，因此，如果该抗原再次进入机体，记忆细胞会触发一个强烈的免疫反应，这个反应与原先的不一样，原先的免疫反应发生得比较慢，而重复的反应是立即发生的。

免疫接种过程是企图利用由免疫系统提供给的自然防御机制，包括人工暴露免疫系统至抗原制品，这种过程引起对特殊致病菌的主动的免疫反应。如果已产生免疫反应的人再次与这种抗原相接触，会立即产生一种特异的免疫反应，这就会很快破坏引起机体不适的抗原，不至于引起全面的感染。

因此，疫苗是一种通常由病原体或与病原体相关的抗原成分组成的制品，在接种疫苗以后，刺激免疫反应，因而使机体产生有效的免疫力，这就防止以后被相同的或抗原类似的病原体感染，所以疫苗用来预防机体可能已遭遇过的那种疾病再次发生。大多数免疫接种方案包括一个初次剂量，然后在以后合适的时间再给一次或二次追加剂量，确保与引起高水平循环抗体有联系的最大免疫反应的产生。疫苗生产代表了生物技术领域的一个重要的专门市场，许多国家实施了一个系统的免疫接种计划来预防主要的传染病。

可用疫苗制品预防的疾病是由各种病原体引起的，包括病毒、立克次体和各种微生物，预防其他有害生物体，例如毒素的疫苗也已经被制备了。或许引起人工免疫的最有效的方法是暴露受体到包含少量这种实际病体的疫苗，但实际上这种方法很少采用，因为存在危险性，受体会感染无法控制的疾病。死的、失活的或减毒的细菌或病毒常被用作疫苗，这种疫苗几乎没有或没有毒力，但是具有野生型病原体类似的免疫特征。病原体可以通过各种化学或物理方法杀死或失活，将病原体在非自然宿主中培养可减毒，对付各种细菌毒素的安全疫苗制品的制备是将毒素失活，这样既除去了毒素的毒性、又保存了毒素的免疫原性。

这种制品有一个或更多的缺点，死的或失活的病原体与其野生型相比其免疫原性明显低，如果用来杀死或失活病原体的方法不是自始至终100%有效，那么有可能偶尔把有毒的病原体作为疫苗使用，即使不严重，一些减毒苗也有重新转变成野生型的危险。通过使用病原体的被纯化的抗原成分，就可降低这种理论上的危险性。表面多糖蛋白已被纯化并被用来在几个实例中诱导有效的免疫力。表5.5列举了商业上现有的主要的常规疫苗制品。

表 5.5　常用于诱导有效免疫力的疫苗制品

疫　苗	制备方法	用　途
卡介苗(Bacillus Calmette-Guérin)	活的结核分支杆菌减毒株	预防结核病
麻疹疫苗	活的麻疹病毒减毒株通常用鸡胚培养细胞繁殖	预防麻疹
流行性腮腺炎疫苗	引起腮腺炎的腮腺炎副黏病毒的减毒株，通常用鸡胚细胞繁殖	预防流行性腮腺炎
风疹疫苗	活的风疹病减毒株用培养细胞繁殖	预防风疹
脊髓灰质炎疫苗(萨宾疫苗，口服)	活的脊髓灰质炎病毒减毒株用培养细胞繁殖	预防脊髓灰质炎
脊髓灰质炎疫苗(索尔克疫苗，注射用)	细胞培养后灭活的脊髓灰质炎病毒	预防脊髓灰质炎
黄热病疫苗	鸡胚培养的活的黄热病毒减毒株	预防黄热病
霍乱疫苗	霍乱弧菌死菌	预防霍乱
流感疫苗	单个或混合的流感病毒灭活株或流感病毒表面抗原(如血红细胞凝集素和神经氨酸酶)的悬液	预防流感
百日咳疫苗	百日咳博代杆菌的死菌	预防百日咳
鼠疫疫苗	甲醛灭活的鼠疫耶尔森菌	预防鼠疫
狂犬病疫苗	狂犬病毒灭活株	预防狂犬病
伤寒疫苗	死的伤寒沙门氏菌	预防伤寒
斑疹伤寒疫苗	杀死的斑疹伤寒立克次体(普罗互泽克立克次体)	预防斑疹伤寒
水痘-带状疱疹疫苗	活的减毒的水痘病毒	预防鸡痘
白喉疫苗	白喉棒状杆菌的甲醛处理过的毒素(一种类毒素)	预防白喉
破伤风疫苗	破伤风梭菌的经甲醛处理的毒素(一种类毒素)	预防破伤风
乙肝疫苗	用遗传工程生产的或从携带者血浆中分离的乙肝表面抗原	预防乙型肝炎①
嗜血流感疫苗	纯化的 B 型流感嗜血杆菌的夹膜多糖	预防流感嗜血杆菌-婴儿脑膜炎的主要病因
脑膜炎球菌疫苗	从一个以上脑膜炎奈瑟菌血清型获得的纯化的多糖抗原	预防引起脑膜炎流行的脑膜炎奈瑟菌
肺炎球菌疫苗	从不同血清型肺炎链球菌纯化的多糖抗原	预防肺炎球菌病

① 简称“乙肝”。

5.7.2　重组疫苗

最近疫苗研究的进展主要集中在重组 DNA 技术方面，这种技术允许在重组大肠杆菌、酵母菌或哺乳动物细胞中生产病原体的特异蛋白抗原，这种与野生型来源相同的蛋白抗原已被纯化并作为疫苗。该疫苗生产方法与常规的疫苗生产方法相比有以下几个优点：

① 临床上使用安全；

② 能大量供应；

③ 是一种确定的产品；

④ 不大可能引起副作用。

因为重组疫苗是由病原体的单一成分组成的，所以是非常安全的，接种这种疫苗不会致病，而且这种制品也不可能被其他病原体污染，接种这种确定的结构不太复杂的疫苗也不太可能引起没有预料到的不利的临床反应。用重组方法生产疫苗也保证了连续、方便地提供安全材料，这有助于使产品价格下降，防止偶尔把疾病传播给疫苗制造者。除了这些单组分疫苗外，还有一些联合疫苗，如麻疹、流行性腮腺炎和风疹三联疫苗，以及白喉、破伤风和百日咳三联疫苗。

5.7.3　以乙型肝炎为基础的重组疫苗

被批准用于人的第一个重组疫苗是乙肝疫苗，传统的乙肝疫苗是从感染者的血浆中分离纯化的乙肝表面抗原（hepatitis B surface antigen，HBsAg）制成的。当从血浆中分离时，通常不能发现游离的 HBsAg 多肽，而是直径为 22μm 的多肽颗粒。用这种方法制备的乙肝疫苗有几个缺点：在最终的制品中可能被有活性的乙肝病毒颗粒污染，或被其他的像 HIV 一类病毒污染；而且依赖于经常性地提供感染者的血浆。

几年以前，HBsAg 已被克隆并在多种表达系统中表达（表 5.6），用酿酒酵母生产的 rHBsAg 是第一个被批准用于临床的重组亚单位疫苗（1986 年，美国），从那以后，又有一些在酿酒酵母中生产的 rHBsAg 被批准上市。重组分子的纯化常用抗-HBsAg 抗体进行免疫亲和层析。rHBsAg 可以单独用作单价苗，也可作为预防多种病原体的联合疫苗中的一个成分，Tritanrix-HB 便是这种联合疫苗的一例，由 SmithKline Beecham 生产的这种制品可以预防白喉、破伤风、百日咳毒素和乙型肝炎。其他乙肝抗原，例如它的核心抗原（HBcAg）也已被成功地在重组系统中生产。

许多来自其他各种病原体的蛋白抗原也已用重组技术生产了（表 5.7），还有许多正在进行临床试验。

表 5.6　用于生产 rHBsAg 的重组系统

类　型	重组系统
细菌系统	大肠杆菌
酵母系统	酿酒酵母
哺乳动物系统	猴肾细胞
	人肝癌细胞系
	猴肾细胞

表 5.7　用重组系统生产的其他病原体的以蛋白质为基础的抗原

表达抗原	用　途
百日咳表面抗原	预防百日咳
破伤风毒素片段 C	预防破伤风
血细胞凝集素	预防流感
甲肝衣壳蛋白	预防甲肝
脊髓灰质炎病毒衣壳蛋白	预防脊髓灰质炎
狂犬病毒糖蛋白	预防狂犬病
表面糖蛋白 D	预防疱疹

百日咳表面抗原（p69）基因已被克隆并在大肠杆菌获得高表达，博代杆菌家族的两个成员（*Bordetella pertussis* 和 *Bordetella parapertussis*）是百日咳的致病因子。传统的百日咳疫苗是由死的百日咳博代杆菌组成的，从重组纯化的诸如 p69 表面抗原很可能成为第二代百日咳疫苗制品。

为了发展另一个可能的破伤风疫苗，破伤风的毒素片段也已被在大肠杆菌中生产，目前破伤风毒素的生产包括用甲醛处理毒素，因此形成类毒素。天然的破伤风毒素是由分子质量为 150ku 的一条单独的多肽链组成，完整毒素蛋白分解断裂成两个片段，片段 AB 是毒素 N 端部分，分子质量为 100ku，而片段 C 是分子质量为 50ku 的羧基末端，该片段 C 没有毒性，在实验动物中能引起抵御破伤风的有效免疫反应，重组的 C 片段制品有可能成为第二代破伤风疫苗。

好多源自其他病原体的抗原也已用重组系统表达，以便评价作为亚单位疫苗的效果，因为有些重组蛋白体必须要进行一些翻译后的修饰，最好的方法是用哺乳动物细胞如 CHO 细胞系作为重组宿主。

5.7.4 设计疫苗的其他方法

其他的几个方法也用于现代疫苗的生产，其中一个方法是包括分离或合成编码病原体的一个特殊的表面抗原基因或 cDNA，然后将它引入临床上没有危害的病毒，通常是融合到一个病毒的表面蛋白，因此牛痘苗病毒是经常被采用的，在用这种活的重组病毒免疫以后，不仅对病毒本身产生恒定的免疫力，而且对与插入基因对应的病原体也有免疫力（图 5.9）。为了构建预防乙肝和 HIV 的重组疫苗，乙肝病毒和 HIV 的基因已被插入至痘苗基因组。以后的动物试验证实这些疫苗载体能引起对付这些病原体的免疫反应。

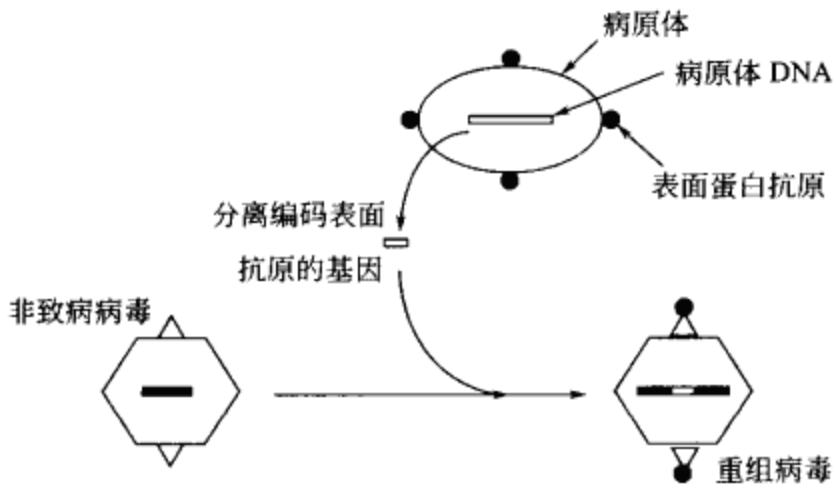


图 5.9 构建重组疫苗载体的基本策略

鉴定和分离目标病原体的表面抗原基因，然后将其导入临床上安全的病毒（如牛痘）的基因。为了确保被导入的基因被表达在病毒细胞表面，常将目的基因与编码一个病毒表面蛋白融合

另一种途径是合成一段与病原体的一段蛋白抗原相同的多肽，这种方法是非常引人注目的，因为能产生一种安全的疫苗制品，而且没有危害物质的污染。被任何蛋白质选定的构象结构有助于决定它的抗原性水平，有很多这方面的例子，一些破坏天然构象的处理导致不能产生强的免疫反应。好多在表面抗原能引起抗体的表位是通过蛋白质特殊的构象结构产生的，短的肽序列不能准确地产生这种表位，因此，接种它可能是无用的。

5.7.5 抗独特型抗体作为疫苗

抗独特型抗体也可能被用作疫苗，机体在遇到任何抗原以后，它的免疫系统会引起一个特异的免疫反应，免疫刺激的一个结果是产生 B 淋巴细胞，然后 B 淋巴细胞产生能特异识别和结合到外源抗原表位的抗体。这种抗体的抗原结合位点位于它们的超可变区（见第 6 章）。超可变区本身也包含能刺激产生另外一系列抗体的抗原决定子，存在于超可变区上的抗原决定簇常被称为独特型，由第一抗体的超可变区产生的第二抗体称为抗独特型抗体。

一些抗独特型抗体能识别第一抗体的不直接参与结合外源抗原物质的可变区内的表位，但是另一些抗独特型抗体是由存在于组成第一抗体的抗原结合位点的超可变区内的特异表位引起的。这种抗独特型抗体携带被称作为原始抗原的内在影像，能模仿抗原，它们因此能够引起产生识别和结合这种原始抗原的抗体。

抗独特型抗体能用来预防由各种病原体引起的疾病，这样的抗体在实验室内被用来预防 HBsAg、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、肺炎链球菌和罗德西亚锥虫（睡眠病的致病因子），但是至今大量抗独特型抗体试验仅限于动物试验。

通过重组 DNA 技术生产亚单位苗在不久的将来可能对疫苗技术产生巨大的影响，抗独特型抗体作为一些特殊的菌苗制品可能发现一些重要的应用，很多抗原决定子性质上不是蛋白质，因此不能用重组 DNA 技术生产，但是可以制备这种抗原的抗独特型抗体用作有效的疫苗。

5.8　艾滋病疫苗

发展一个预防 HIV 的疫苗仍然是疫苗研究的热门课题，HIV 是艾滋病的致病因子，虽然这种不可救药的病的传播速度在西方世界正在下降，但是在非洲和世界其他贫穷地区的迅速增长达到了危险关头。据世界卫生组织统计，HIV 感染者超过 7000 万，年死亡率超过 200 万。

HIV 是逆转录病毒，它的遗传物质是 RNA，RNA 与诸如逆转录酶和整合酶位于病毒的核心部位，该核心材料依次被核蛋白 p24 包围。病毒的外壳是由原先来自宿主细胞膜的一种膜结构组成，病毒颗粒就在这种膜结构内被合成。从膜突出的部分是糖蛋白 gp120，另一个糖蛋白 gp41 被发现包埋在膜外壳中，gp120 和 gp41 二者都在病毒复制期间通过蛋白水解断裂糖蛋白 gp160 而产生的，另一个蛋白 p17 位于病毒外壳的下面。

HIV 能结合到某些类型的细胞，敏感细胞必须在它们的表面呈现一个称为 CD4 的蛋白，以促进病毒黏附，CD4 标志仅位于被选择的细胞类型，最明显的是 T 辅助细胞，这些细胞在产生细胞介导的免疫中起关键性作用。病毒通过它的外壳糖蛋白 gp120 结合至 CD4，在进入细胞后，病毒 RNA 用作反转录酶的模板，因此产生 DNA，然后病毒 DNA 整合至宿主基因组，这是由整合促进的过程。一旦整合，病毒基因可以保存在基因组上很长时间，如果被感染的细胞分裂，病毒的基因会与宿主染色体 DNA 一起复制，但是 DNA 的激活导致产生无数的病毒颗粒，这些颗粒最终从宿主细胞膜中释放出来，进入血流，在细胞内特别迅速地繁殖甚至会导致宿主细胞裂解。

为了发展一个有效的艾滋病疫苗，几个不同的方法继续被评价：给予少量的活的野生型病毒以引起免疫保护反应看来显然是有问题的；用病毒的活的减毒株组成的疫苗也是不可能的，由于有可能回复突变到有毒力的形式，而且很难预言是什么组成了一个安全减毒 HIV 病毒，因为病毒破坏免疫系统的分子基础还不清楚。

失活的病毒颗粒可能组成一个潜在的有效疫苗，通过化学（甲醛）加上照射处理失活的病毒制品目前正在进行临床评价。野生型病毒株起初是通过加热失活的。抗独特型抗体和合成肽技术作为潜在的疫苗制品正在研究中，目前正在进行临床试验的大部分疫苗制品是由通过重组 DNA 技术生产的病毒的特殊抗原组成的。关于这一点，已报道了一些混乱的结果，好多这种抗原是由重组的 gp160、gp120 或这些分子的片段组成的。为了便于翻译后的糖基化，这些重组分子通常用哺乳动物细胞系生产。虽然 gp160 和由 gp160 衍生而来的 gp120 的突变率很高，但是研究者认为很可能这些特殊序列仍然是很保守的。在疫苗制品中，存在如此保护性抗原决定子在理论上应该有助于提供预防广泛的 HIV 株的免疫原性。

目前正在评价的几个其他疫苗制品是由重组核心抗原如 p24 和 p17 组成的，这些蛋白质与外壳蛋白相比遗传漂变小，因此它们提供了制备具有广泛特异性疫苗制品的希望。已知当艾滋病病人的免疫功能下降时，识别病毒核心蛋白的循环抗体水平也下降。与此相反，识别外壳糖蛋白的循环抗体水平仍然是高的，因此专门刺激产生抗核心蛋白抗体的疫苗可能对抑制已有各种合并感染艾滋病的发展特别有效。

一个成功诱导对野生型病毒有靶向免疫反应的疫苗能被用作预防或治疗剂，一个有效的预防艾滋病疫苗应该在病毒进入机体后立即产生一个对付这种病毒的免疫反应，以至于在感染还没有建立以前就将病毒破坏。发展治疗疫苗的基本原理是基于这样的事实：在感染

HIV 以后，宿主的免疫反应在很长一段时间内防止病毒广泛复制，这就防止了疾病的发展，病人在临床上仍然是无症状的，因此有望用于治疗的疫苗能刺激免疫功能足以进一步延迟疾病临床症状的发展。

但是由于种种原因，发展一个有效的预防 HIV 疫苗是很难的，因为 HIV 的突变频率比任何其他病毒都高，因此能对这种病毒的一个株产生保护抗体的疫苗可能对以后产生的遗传变种不产生免疫保护，而且好多艾滋病患者有很高的抗 HIV 循环抗体，但似乎不能阻止疾病的发展，似乎仅体液反应不足以战胜感染。

很可能有效的疫苗必须诱导很强的体液和细胞介导的免疫反应，T 细胞介导的免疫反应在破坏病毒感染的细胞中起关键作用。只有 T 淋巴细胞才能破坏表面显示外源病毒抗原的细胞，好多（即使不是全部）传统疫苗制品只能有效刺激抗体介导的免疫反应。

HIV 常进入新的宿主，不是以游离的颗粒存在，而是以感染细胞的形式存在，这使发展一个有效的疫苗很困难，而且免疫监视可能不能识别和破坏整入的病毒 DNA 仍然是静止的那些细胞。此外，缺乏能引起艾滋病的动物模型也使得很难进行潜在疫苗的临床前试验。黑猩猩可能是最好的动物模型，但是它们是属于被保护的动物，目前供应不足。

为了战胜 HIV 的感染，除了发展疫苗以外，正在研究几个其他的策略，已知抑制病毒的整合酶或逆转录酶的抗病毒药物目前正在被评价，但是好多这种药物没有特异性，因此往往显示出严重的副作用。

另一些研究是靶向整合的 DNA，目的是为了防止病毒基因被激活。正在积极考虑之中的其他一些策略包括生产重组可溶性的 CD4 蛋白分子，正如以前讨论过的，病毒感染起始于结合至在敏感细胞表面发现的 CD4 蛋白，因此非胃肠道途径给予的大量可溶性的 CD4 分子可作为病毒的诱骗受体。

5.8.1 癌症疫苗

据估计有 8000 万人患癌症，每年的死亡率超过 700 万，由于肿瘤的外科和非外科治疗的进展，存活率继续提高。另一个与肿瘤作斗争的措施是发展有效的肿瘤疫苗，目前有 40 多种这种疫苗正在进行临床试验。

近 20 年来科学家们已知细胞的转化常导致细胞表面性质改变，早期发展肿瘤疫苗的企图集中在机械破坏或照射肿瘤细胞。识别与一些类型肿瘤有联系的特异肿瘤表面抗原（tumour surface antigens，TSA）（第 6 章）促进了更合理地发展肿瘤疫苗，好多这种试验性的疫苗是由重组可溶性特异的 TSA 组成的，还有一些例子是编码 TSA 的部分或全部核苷酸序列已被表达在融合到病毒的一个表面抗原的病毒载体中（例如痘苗）。尽管这种途径是有希望的，但是发展一个真正有效的癌症疫苗牵涉到很多因素，正如在第 6 章进行过详细讨论的那样，TSA 不只在肿瘤细胞表达，因此靶向 TSA 即使在非转化细胞上低水平表达也能导致在疫苗的受体内发展自身免疫类型的疾病。

发展肿瘤疫苗的另一个途径是发展以 DNA 为基础的疫苗，20 世纪 90 年代的试验显示通过肌注动物的一部分外源质粒 DNA 能被肌肉细胞吸收，而且证明一旦进入肌肉细胞内，外源 DNA 通过核膜并作为非复制的附加体分子保留在核内，通常能观察到外源 DNA 的低水平但长时间的表达，通过用这种方法将编码 TSA 的核苷酸引入（和以后的表达）体细胞可以证明是免疫接种预防肿瘤的一个有效方法。

5.8.2　佐剂技术

许多抗原当它们独自使用时，只能产生很差的免疫反应，重组亚单位疫苗也是如此，它们通常引起一个好的 B 细胞反应，但 T 细胞反应很差。因此抗原制品通常与称为佐剂物质联合使用，佐剂通过好多途径来增强对注入抗原的免疫反应，例如它们一般提高抗原的免疫原性，它们也可能保护抗原不会快速失活和被除去，佐剂也可以通过增加抗原提呈到各种类型的免疫细胞来增加抗体的产生。目前用于人的佐剂只有铝盐，例如氢氧化铝［$Al(OH)_3$］或磷酸铝（$AlPO_4$），这种佐剂对注射的抗原增强体液免疫反应大约 100 倍，它们几乎没有副作用。

各种比较有潜力的佐剂制品也是有供应的，它们包括：①弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂（Freund's complete adjuvants/Freund's incemplete adjuvants，FCA/FIA）；②死的百日咳细胞悬液；③分支杆菌和其他细胞壁的有免疫刺激的成分。弗氏完全佐剂是由在水-油乳剂中的肺炎分支杆菌混合物组成，常用的乳化剂被称为山梨醇单油酯（商品名 Arlacel A），而采用的油通常是矿物油，弗氏不完全佐剂没有分支杆菌的成分。以弗氏为基础的佐剂由于使用后有副作用，还没有被批准用于人，只限于在动物中应用。这种副作用包括严重的局部刺激作用以及形成肉芽肿。

存在于分支杆菌制品中的有免疫刺激的成分看来是胞壁酰二肽（muramyl dipeptides，MDP），特别是 *N*-乙酰胞壁酸-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺（*N*-acetyl muramyl L-alamyl-D-iso-glutamine）和海藻糖二霉菌酸酯（trehalose dimycolates，TDM）。发现的这些分子是与分支杆菌的细胞有联系，*N*-乙酰二霉菌酸酯胞壁酰是肽聚糖的基本成分，这是在细菌细胞壁中发现的结构多聚物。海藻糖二霉菌酸酯是由两个分子的分支菌酸与一个分子海藻糖经共价连接组成的。海藻糖是由经糖苷键连接的两个葡萄糖残基组成的一个二糖（图 5.10），分支菌酸是一个羟基化的脂类分子，它广泛存在于分支杆菌表面（图 5.10）。

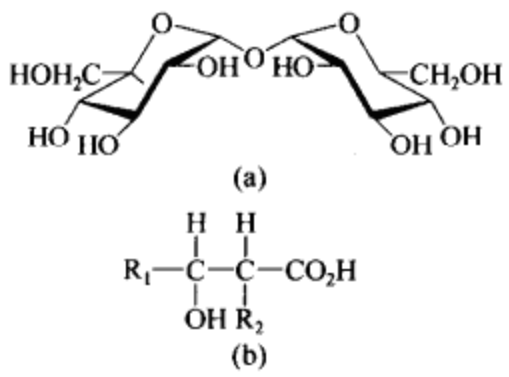


图 5.10

(a) 海藻糖（α-D-吡喃型葡萄糖 1⟶1α-D 吡喃型葡萄糖）结构式；(b) 分支菌酸结构式，在分支菌酸内的 R_1 和 R_2 基团代表长链脂肪烃

来自分支杆菌细胞壁中包含这种免疫刺激剂的经纯化的抽提物也可以组成有价值的佐剂材料，它们的使用明显刺激抗体的产生和提高细胞介导的免疫功能，这些刺激剂是致热的，因为它们能增强释放白介素 1（interleukin-1，IL-1，内部的热源）。各种胞壁酰二聚体已有化学方法被合成，其中一些能诱导免疫刺激反应。

死的百日咳细胞悬液有时也用作佐剂材料，已知百日咳毒素刺激抗体产生，来自死细胞的 LPS 也可以通过诱导 IL-1 的分泌来刺激免疫功能。

5.9　进一步的阅读材料

图书

Aledort, L. (1996) *Inhibitors to Coagulation Factors*. Plenum Publication Co., New York.

Becker, R. (2000) *Fibrinolytic and Antithrombotic Therapy*. Oxford University Press, Oxford.

Chung, Y. L. (1991) *Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation and Fibrinolysis*. Plenum Publishing Co., New York.

Cohen, S. (1996) Novel strategies in the design and production of vaccines. Plenum Publishing Co., New York.

Institute of medicine (1996) *Blood and Blood Products*. National Academy Press, Washington, DC.

O'Hagan, D. (2000) *Vaccine Adjuvants*. Humana Press, New York.

Peters, T. (1995) *All About Albumin*. Academic Press, London.

Plotkin, S. (1999) *Vaccines*. W. B. Saunders, Philadelphia.

Poller, L. (1996) *Oral Anticoagulants*. Arnold, London.

Powell, M. (1995) *Vaccine Design*. Plenum Publishing Co., New York.

Ratnoff, O. (1996) *Disorders of Haemostasis*. W. B. Saunders, Philadelphia.

Rizza, C. (1997) *Haemophilia and Other Inherited Bleeding Disorders*. W. B. Saunders, Philadelphia.

Rudolph, A. et. al. (1997) *Red Blood Cell Substitutes*. Marcel Dekker, New York.

Stern, P. (2000) *Cancer Vaccines and Immunotherapy*. Cambridge University Press, Cambridge.

Tsuchida, E. (1998) *Blood Substitutes, Present and Future Prospects*. Elsevier, Amsterdam.

论文

凝血因子

Foster, P. (2000) Prions in blood products. *Ann. Med.* **32** (7), 501－513.

Fox, J. L. (1992) FDA panel okays two factor VIII's with conditions. *Bio/Technology* **10**, 15.

Legaz, M. *et al.* (1973) Isolation and characterization of human factor VIII (antihemophilic factor). *J. Biol. Chem.* **248**, 3946－3955.

Lowe, K. (1999) Perflourinated blood substitutes and artificial oxygen carriers. *Blood Rev.* **13** (3), 171－184.

Lusher, J. (2000) Recombinant clotting factors-A review of current clinical status. *Biodrugs* 13 (4), 289－298.

Peiry, D. (1997) Factor X and its deficiency states. *Haemophilia* **3** (3), 159－172.

Sallah, S. (1997) Inhibitors to clotting factors. *Ann. Hematol.* **75** (1－2), 1－7.

抗凝剂、融血剂与相关血液制品

Albers, C. *et al.* (2001) Antithrombolytic and thrombolytic therapy for ischemic stroke. *Chest* 119 (1), 300S－320S.

Becker, R. (1999) New thrombolytic, anticoagulants and platelet antagonists: the future of clinical practice. *J. Thromb. Thrombol.* **7** (2), 195－220.

Collen, D. (1998) Staphylokinase: a potent, uniquely fibrin-selective thrombolytic agent. *Nat. Med.* **4** (3), 279－284.

Datar, R. *et al.* (1993). Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/Technology* **11**, 349－357.

Denman, J. *et al.* (1991). Transgenic expression of a varient of human tissue type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Bio/Technology* **9**, 839－842.

Ebert, K. M. *et al.* (1991) Transgenic production of a variant of human tissue type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Bio/Technology* **9**, 835－838.

Lubenow, N. & Greinacher, A. (2000) Management of patients with heparininduced thrombocytopenia; focus on recombinant hirudin. *J. Thromb. Thrombol.* **10**, S47－S57.

Markwardt, F. (1991) Hirudin and derivatives as anticoagulant agents. *Thromb. Haemost.* **66**, 141－152.

Ogden, J. (1992) Recombinant haemoglobin in the development of red-blood-cell substitutes. *Trends Biotechnol.* **10**, 91－95.

Rydel, T. J. & Tulinsky, A. (1991) Refined structure of the hirudin-thrombin complex. *J. Mol. Biol.* **221**, 583－601.

Sawyer, R. T. (1991) Thrombolytics and anticoagulants from leeches. *Bio/Technology* **9**, 513－518.

Symons, P. *et al.* (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technology* **9**, 217－221.

Vandegriff, K. (1992) Blood substitutes; engineering the haemoglobin molecule. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* **10**, 403－453.

Verstaete, M. (2000) Third generation thrombolytic drugs. *Am. J. Med.* **109** (1), 52－58.

Wright, G. *et al.* (1991) High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technology* **9**, 830－834.

疫苗技术

Allison, A. C. & Bayrs, N. (1987a). Vaccine technology: developmental strategies. *Bio/Technology* **5**, 1038－1040.

Allison, A. C. & Bayrs, N. (1987b). Vaccine technology: adjuvants for increased efficacy. *Bio/Technology* **5**, 1041－1045.

Bolognesi, D. P. (1990) Approaches to HIV vaccine design. *Trends Biotechnol.* **8**, 40.

Cohen, J. (1993). Naked DNA points way to vaccines. *Science* **259**, 1691－1692.

Hansson, M. *et al.* (2000) Design and production of recombinant subunit vaccines *Biotechnol. Appl. Biochem.* **32**, 95－107.

Herlyn, D. & Birebent, B. (1999) Advances in cancer vaccine development. *Ann. Med.* **31**, 66－78.

Horig, H. & Kaufman, H. (1999) Current issues in cancer vaccine development. *Clin. Immunol.* **92** (3), 211－223.

Kohler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495－497.

Mahon, B. *et al.* (1998) Approaches to new vaccines. *Crit. Rev. Biotechnol.* **18** (4), 257－282.

Markoff, A. J. *et al.* (1990) Protective surface antigen P69 of *Bordetella pertussis*: its characterization and very high level expression in *Escherichia coli*. *Bio/ Technology* **8**, 1030.

McAleer, W. J. *et al.* (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* **307**, 178－180.

Moingeon, P. (2001) Cancer vaccines. *Vaccine* **19**, (11－12), 1305－1326.

Peters, B. (2000) HIV immunitherapeutic vaccines. *Antiviral Chem. Chemother.* **11** (5), 311－320.

Salk, J. *et al.* (1993) A strategy for prophylactic vaccination against HIV. *Science* **260**, 1270－1272.

Wang, R. & Rosenberg, S. (1999) Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol. Rev.* **170**, 85－100.

(王恒樑　译　　史兆兴　校)

第6章

治疗用抗体和酶

6.1 引　　言

抗体和酶类被广泛用于体外诊断目的（第 9 章），多克隆抗体制剂用于治疗目的以诱导被动免疫也有几十年的时间了，最近发现单克隆抗体制剂和采用重组 DNA 技术制备的抗体片段同样具有治疗作用。本章就抗体和酶制剂在体内的医学应用进行综述。

6.2 应用于体内的抗体

6.2.1 多克隆抗体制剂

多种多克隆抗体制剂已应用于临床，通常它们提供立即的免疫保护，用以抵抗特定病原体或其他有害抗原物质对机体的损伤。这种特异抗体制剂的应用称为被动免疫，所用的纯化抗体制剂一般称为抗血清，它与免疫球蛋白制剂有明显差别，前者是指用动物制备的抗体，而后者特指从人源获得的纯化抗体，这两种纯化制剂的主要成分是免疫球蛋白 G（immunoglobulin G，IgG）分子。一些常用的抗血清和免疫球蛋白制剂见表 6.1。

当由于某已知抗原的存在导致病人遭受伤害或加剧伤害时，常采用被动免疫作为治疗手段，这些抗原物质包括病毒、微生物或由某些蜘蛛或蛇产生的毒素。抗体制剂特异地识别侵入机体的抗原并与之结合，从而将其中和或使其灭活，同时外源抗体也可以帮助机体产生针对外源抗原的免疫应答。

与此相反，主动免疫（应用特定抗原作为疫苗使机体自身产生免疫应答，第 5 章）通常被用作预防措施，以防止特定疾病的发生。在某些情况下，被动免疫也可用作预防措施，例如当某人在工作或旅游时可能接触了病原体，预先使用能识别该病原体的抗体可以使机体获得短暂的免疫保护。

表 6.1　通常用以被动免疫的多克隆抗体制剂

抗体制剂	通常来源	抗体特异性
普通免疫球蛋白	人	针对流行于人群中多种病原的广泛特异性
抗乙肝病毒免疫球蛋白	人	乙肝病毒表面抗原特异性抗体
抗麻疹免疫球蛋白	人	麻疹病毒特异性抗体
抗狂犬病免疫球蛋白	人	狂犬病病毒特异性抗体
抗巨细胞病毒免疫球蛋白	人	巨细胞病毒特异性抗体
抗水痘带状疱疹免疫球蛋白	人	鸡痘病原体特异性抗体
抗破伤风免疫球蛋白	人	破伤风杆菌毒素特异性抗体
破伤风抗毒素	马	针对破伤风杆菌毒素的抗体
肉毒抗毒素	马	针对 A、B 或 E 型肉毒梭菌的毒素的抗体
白喉抗毒素	马	针对白喉毒素或类毒素的抗体
气性坏疽抗毒素	马	针对诺氏梭菌、产气荚膜杆菌或败血杆菌等的 α-毒素的抗体
抗蝎毒血清	马	针对一种或多种蝎子的毒素的抗体
抗蛇毒血清	马	针对各种毒蛇毒素的抗体
抗蜘蛛毒素	马	针对各种蜘蛛(特别是黑寡妇)毒素的抗体

常用大动物来制备特异抗血清，其中以马最为常用。将目标抗原注射到动物体内，从而诱导机体产生免疫应答（图 6.1）。再增强免疫注射以进一步提高抗体应答水平，定期采集免疫动物的血样并用适合的方法检测抗体的滴度。当识别靶抗原的特异抗体的测定值较高时，就可以放血了。

用马等大动物制备抗血清时，每次可以放几升血。待其凝固后就可收集抗血清了，或者直接将血采集到装有合适抗凝血剂的容器内，离心除去血细胞后得到血浆。血清或血浆进行逐步分离以制备纯化的抗体，常规纯化方法包括几步连续的沉淀步骤，通常使用乙醇和/或硫酸铵作为沉淀剂。而较新的纯化法则采用各种层析法（图 6.2），如离子交换层析、疏水柱层析或蛋白 A 柱层析法等。在血液收集、处理和纯化过程中各种方法的采用均以利于生产制备为原则。

在将抗体纯化后，测定其滴度并通过适度稀释或浓缩以调整到合适的滴度，向其中加入 NaCl 或甘氨酸等稳定剂和苯酚或硫柳汞等抗菌剂。过滤除菌后，无菌操作装入无菌的容器内，封口以保持无菌。也可以将抗体制剂冻干保存。抗体溶液常置于无氧的氮气环境中，用以防止在长期储存中抗

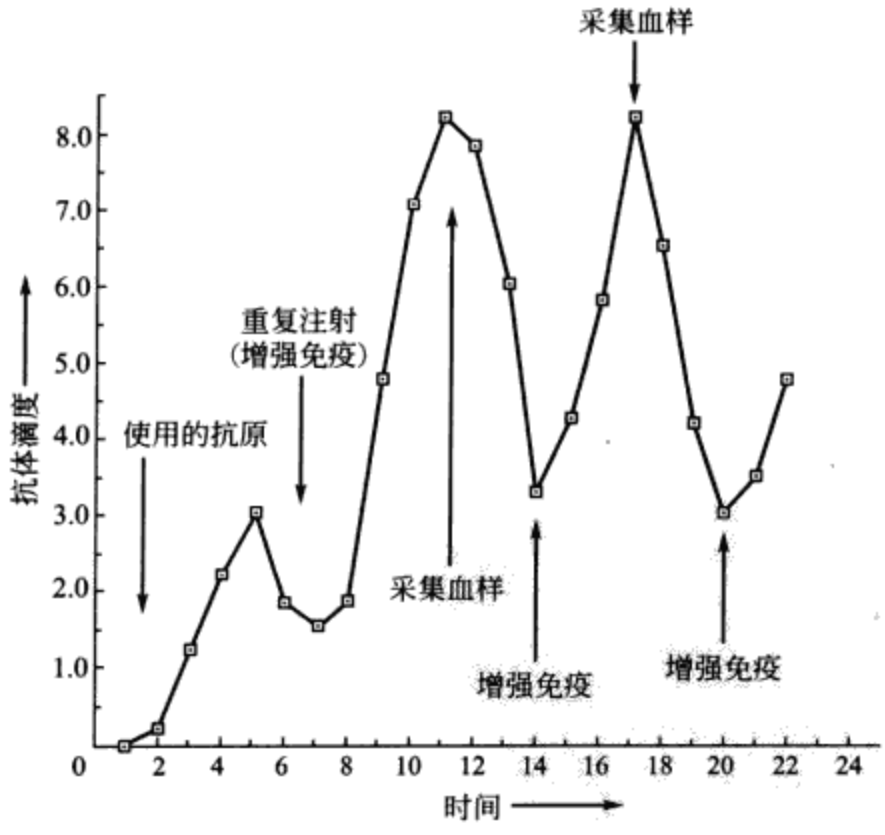


图 6.1　动物抗血清制备示意图

使用目标抗原免疫动物诱导产生免疫反应，血清 IgG 水平升高。反复注射抗原（增强免疫的剂量）以维持高水平的抗原特异性抗体。认真监测抗体水平，以便在最适时机放血（收集抗体），每 7～14d 放一次血

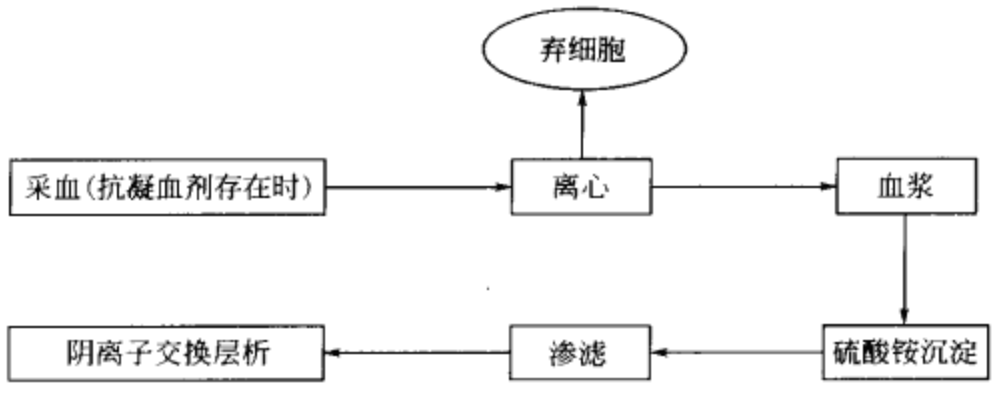


图 6.2　人血浆 IgG 纯化流程

在这种情况下 IgG 不结合到阳离子交换柱上，而其他血浆蛋白则结合到阳离子交换柱上。注意：其他方法或上述过程经变动后也可应用

体的氧化分解。通常储存温度为 2～8℃。在上述条件下，抗体制剂的储存寿命可达到 3～5年。

免疫球蛋白可从志愿者的供血中纯化，纯化方法与动物来源抗体的纯化方法大体相同。从正常健康个体的供血中纯化的免疫球蛋白常常包含多种抗体特异性，这是由于供体长时间以来自然或人工地接触到多种抗原所致。同样，当供体被用抗原进行了免疫或刚从该抗原物质导致的疾病中康复，从其供血中纯化到的特异识别该抗原的抗体滴度就很高，例如当某人刚免疫接种了乙肝病毒疫苗或感染了乙肝病毒，其抗乙肝病毒抗体的滴度就很高。

抗体制剂的使用有时会导致一些临床副作用，特别是使用动物源抗血清时。与动物血清的使用潜在相关的副作用包括血清病以及严重时导致的过敏性休克，因此应尽可能使用人源的免疫球蛋白制剂。用于纯化抗体的血清应从健康的动物或人获取，而且在处理前要筛查潜在病原体的存在与否。

当供体血直接用于输血或作为纯化各种血液制品的原材料时，应筛查的病原体范围如下：

① HIV-Ⅰ和 HIV-Ⅱ（A）；
② 乙型肝炎病毒（A）；
③ 丙型肝炎病毒（A）；
④ 梅毒密螺旋体（R）；
⑤ 巨细胞病毒（R）；
⑥ EB 病毒（R）；
⑦ HTLV-Ⅰ和 HTLV-Ⅱ（F）；
⑧ 早老痴呆症（F）。

注意：世界各地在病原体的筛查范围上可能有所不同，但都要筛查 HIV-Ⅰ、HIV-Ⅱ、HBV 和 HCV 等病毒，在上面提及的病原体后加注（A）以表示必检之意；而需定期或经常筛查的则加注（R）来表示，将来可能会进行筛查的加注（F）。

6.2.2　单克隆抗体

单克隆抗体在生物技术领域的应用范围不断扩大，包括：

① 体外诊断试剂；
② 体内诊断目的的研究工具；
③ 治疗药物；
④ 疫苗；
⑤ 免疫亲和层析的配基；
⑥ 催化剂。

一方面是因为抗体自身具备的特异性、选择性和结合抗原的高亲和力，再者是因为可采用杂交瘤技术无限量制备同一种抗体，而最近利用基因重组技术制备单克隆抗体技术的出现则进一步拓宽了这些高度成熟的生物试剂的实用性和有效性。

多数抗原物质的表面带有多个可被抗体识别的表位，因此，当免疫系统遇到这样的抗原时会产生分别识别和结合相应表位的多种抗体（抗体的结构如图 6.3 所示），与特定表位结合的抗体由来源于同一特定 B 淋巴细胞的克隆产生。如果将这种分泌抗体的 B 淋巴细胞或浆细胞分离并成功培养，就可以生产单特异性的抗体（单克隆抗体），然而这样的抗体产生细胞不能以这种方式长期培养。

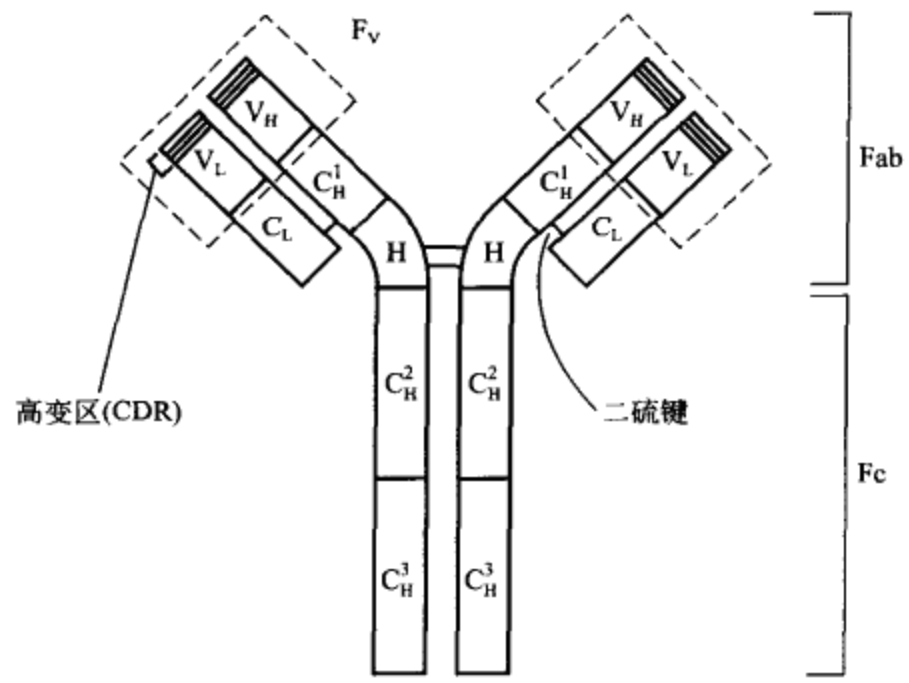
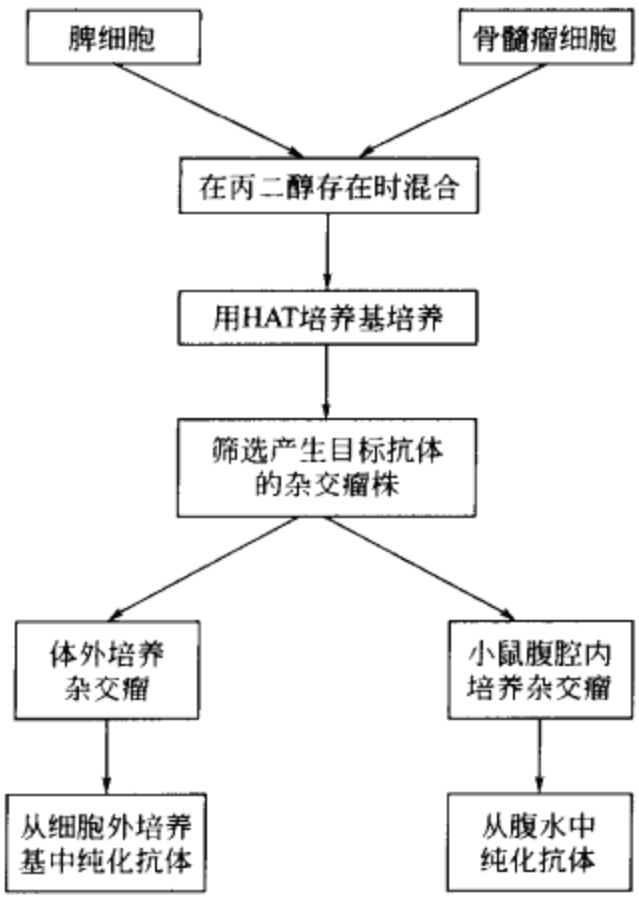


图 6.3　抗体（IgG）的结构

IgG 由两条相同的重链和两条相同的轻链构成，分子呈 Y 形，通过链内、链间二硫键以及非共价键形成稳定结构。用合适的蛋白酶处理，抗体在柔性的铰链区断裂，产生两个抗原结合片段（Fab）和一个恒定区（Fc）。恒定区（Fc）通常介导各种效应功能。重链和轻链都含有可变（V）区和恒定（C）区。可变区含有抗原结合位点，不同特异性抗体的可变区氨基酸序列不同，而恒定区则相反，不是这样。重链和轻链从结构上可分为多个结构域，一个这样的功能域构成重链的可变区（V_H），而重链的恒定区则包括 C_H^1、C_H^2和 C_H^3三个功能域。相反，轻链只含有可变区（V_L）和恒定区（C_L）两个功能域。由 V_H和 V_L功能域形成的抗体片段称为 Fv 片段。每个功能域的结构特征惊人相似，都是噜噗区将 β 折叠连接在一起，可变区（V_H和 V_L）的噜噗区序列高变，构成抗体的抗原结合位点。这些高变区称为互补决定区（CDRs），可变区的其余区域称为框架区，与 CDR 序列相比变化较小。免疫球蛋白是糖蛋白，糖链结合在重链的恒定区，除去糖基不会影响抗体的抗原结合能力，但会影响抗体的各种效应功能

6.2.3 杂交瘤技术

20 世纪 70 年代中期，创立了一种利用源于一个抗体产生细胞来制备单克隆抗体的便利方法，称为杂交瘤技术（图 6.4）。通过观察发现，如果大量的抗体产生细胞与能无限繁殖的骨髓瘤细胞融合，就有得到的一部分杂交细胞既保持了骨髓瘤细胞无限繁殖的特性，同时又能分泌大量的单克隆抗体，这正是杂交瘤技术产生的基础。



该过程首先是用要制备的抗体所针对的抗原免疫小鼠，之后将小鼠杀死（通常在初次免疫后 1～4 周），取出脾脏，将淋巴细胞冲洗出来。典型操作是用 10^8 个脾源淋巴细胞与骨髓瘤细胞在聚乙二醇存在条件下共同孵育以便融合。用于融合的骨髓瘤细胞不能产生次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase，HGPRT），这意味着当用含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶脱氧核苷的培养基（HAT 培养基）进行培养时，这种骨髓瘤细胞不能合成 DNA。通过一个淋巴细胞和一个骨髓瘤细胞的融合产生了部分子代细胞（杂交瘤细胞），它们通常保留了母代淋巴细胞产生抗体的特性和母代骨髓瘤细胞无限繁殖的能力，可以用 HAT 培养基将其筛选出来，没融合的骨髓瘤细胞在 HAT 培养基中不能生长，但融合的细胞可以生长，没融合的淋巴细胞也不能很好地生长甚至死亡，或者很快被杂交瘤所超过，因为杂交瘤细胞生长速度快，每 18～48h 增殖 1 倍。在 HAT 培养基中生长的杂交瘤细胞可通过梯度稀释的方法分离开，培养单个细胞以形成克隆。筛选出产生感兴趣抗体的细胞株，如必要可将其冻存在液氮中保存。可通过两种方法来生产单抗，一是直接进行体外细胞培养来生产单抗，其产量在 μg/ml 水平；再者，可以将杂交瘤细胞注射到活小鼠的腹腔中，杂交瘤细胞长成腹腔肿瘤，所产生的腹水中就含有单克隆抗体，通常其产量是体外培养法的 50～100 倍，然而用这种方法进行大规模生产单克隆抗体会产生伦理问题，同时它也存在缺陷，即腹水中污染有小鼠免疫球蛋白

图 6.4　用杂交瘤技术制备单克隆抗体的流程

制备单克隆抗体的第一步就是从经靶抗原免疫的实验小鼠脾脏中收集淋巴细胞，这些淋巴细胞中有部分细胞可以产生能与抗原表面的特定表位结合的抗体。在诸如丙二醇等促细胞融合剂存在条件下，将淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞共同孵育，这样得到的杂交细胞称为杂交瘤。用特定的选择培养基培养可以从没融合的细胞中筛选出杂交瘤，通过稀释和组织培养分离出能产生抗体的杂交瘤，进一步筛选以确定哪个（些）克隆株能产生识别靶抗原的抗体，将最好的阳性克隆进行培养以制备大量的单克隆抗体。

由于单克隆抗体所展示出来的特异性、选择性和高亲和力结合活性，使它成了一种很有吸引力的生物化学工具，而且一旦鉴定分离出合适的杂交瘤，就可以无休止地生产出大量的特定抗体。与此相反，多克隆抗体制剂中抗体特异性的范围和数量在不同批次的血样间可能会有所变化，而且当最初的制备用动物死亡后，难以用替换的动物精确复制出同样的效果。

杂交瘤技术是用于制备单克隆抗体的常规方法，然而基因工程的出现使采用重组体系制备抗体或抗体片段更为方便，具体如后文所述。最近批准的许多单克隆抗体产品（以及多数用于临床试验的产品）是采用重组方法制备的。

6.2.4　已获批准体内应用的抗体

1986 年 OKT3 作为第一个获准体内应用的单克隆抗体用于治疗目的，它被用于促进对急性肾移植排斥反应的逆转。OKT3 特异识别有关所有 T 细胞分化的细胞表面抗原 CD3，抗体与 CD3 结合后可诱导 T 细胞的破坏，这些 T 细胞介导移植组织引发排斥反应。与传统的免疫抑制药物相比，用 OKT3 进行治疗来防止移植排斥反应更为有效，但是，它的使用通常会诱导许多细胞因子的释放，而这些细胞因子则会引起许多有害的临床反应。

到 2000 年为止，已经有 18 个单克隆抗体产品获准用于体内诊断或治疗（表 6.2），其中 7 个用于各种类型癌的检测诊断，3 个打算用于对特定癌的治疗。大约 90 个单克隆抗体产品正在进行临床评价（表 6.3）。所有这些使得抗体（以及疫苗）成了用于临床试验的最多种类的药用生物制品。

表 6.2　已获准用于体内的单抗产品（截止到 2000 年）

商　品　名	适　应　症
CEA-SCAN	复发结肠直肠癌的检测
OncoScint	结肠直肠癌和卵巢癌的检测
ProstaScint	前列腺癌的检测
Verluma	小细胞肺癌的检测
Indimacis 125	卵巢腺癌的诊断
Humaspect	结肠直肠癌的检测
Rituxan	非何杰金氏淋巴瘤的治疗
Tecnemab K1	黑素瘤的诊断
Herceptin	某些型乳癌的治疗
Mabthera	非何杰金氏淋巴瘤的治疗
Remicade	克罗恩氏病(节段性回肠炎)的治疗
OKT-3	逆转急性肾移植排斥反应
Zenapax	预防急性肾移植排斥反应
Simulect	预防急性肾移植排斥反应
MyoScint	心肌梗死显像剂
LeukoScan	骨髓炎病人骨感染的成像
ReoPro	预防血栓
Synagis	下呼吸道疾病的治疗

表 6.3　临床试验中单抗产品的医用范围

医　用　范　围	用于实验的产品数量
艾滋病	3
自身免疫性疾病	8
血液病	1
癌症	37
心脏病	6
消化疾病	5
传染病	5
神经性疾病	7
呼吸系统疾病	6
移植	8
其他疾病	2

注：引自 Pharmaceutical Research and manufacturers of America。

6.2.5 基于抗体的肿瘤检测和杀伤

开发用于体内癌细胞检测和杀伤的抗体的先决条件就是要确定靶细胞特有的表面抗原，制备的针对独特表面抗原（unique surface antigen，USA）的抗体因此只和该类型的细胞结合（图 6.5）。

当正常细胞发生癌变后，之前不表达（或低水平表达）的一些基因开始获得表达，部分新合成的蛋白保留在转化细胞的表面，这些肿瘤表面抗原（tumour surface antigen，TSA）就成了癌细胞表面的独特表面抗原，针对肿瘤表面抗原的抗体就能靶向这些细胞。对肿瘤表面抗原的鉴定一直是研究的一个热点。癌胚抗原（carcinoembryonic antigen，CEA）是最典型的肿瘤表面抗原中的一个，这个 180ku 的跨膜糖蛋白常常高水平表达在结肠直肠肿瘤细胞的表面。TAG-72 和 CO17-1A 是另外的结肠直肠癌肿瘤表面抗原。与其他类型癌相关的肿瘤表面抗原包括 G250（肾癌）和叶酸结合蛋白（卵巢肿瘤）。

用抗肿瘤表面抗原单抗检测或杀伤人类肿瘤有 4 种策略：①直接使用未修饰的抗体或能结合抗原的抗体片段；②放射性标记；③偶联毒素；④偶联前体药物激活酶类（图 6.6）。

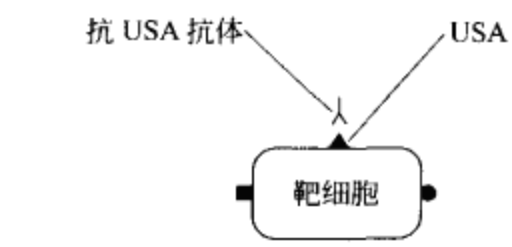


图 6.5 用于体内靶向特定类型细胞的抗体产品的特异性基础

产生的抗体针对仅存在于靶细胞表面的抗原（unique surface antigen，USA），静脉注射的抗体只结合到靶类型细胞的表面

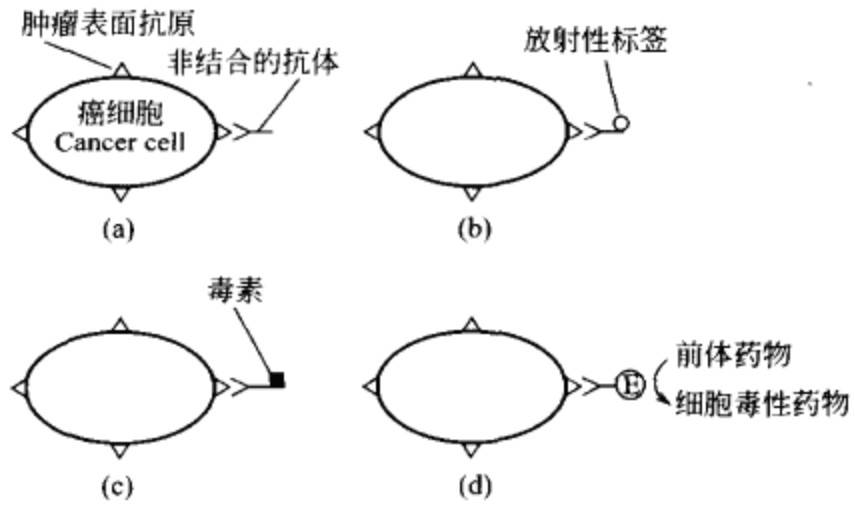


图 6.6 单抗介导的肿瘤检测/杀伤的途径

详细描述参阅正文

1. 未结合的抗体

未修饰抗体的使用可通过其 Fc 段的免疫学效应（如激活补体和吸引吞噬细胞）潜在引起肿瘤细胞的破坏，但总体而言，用未修饰抗体进行的临床试验的结果令人失望，许多因素导致其没有效用，如：

①（至少初期）使用的单抗是采用杂交瘤技术制备的鼠源抗体，这种鼠源抗体的 Fc 段激活人类免疫效应的能力很差，而且鼠源抗体本身会成为人类免疫反应的靶子；

② 在大多数情况下肿瘤表面抗原的表达既不稳定也不一致，甚至在某些特定的时间有一部分肿瘤细胞根本不表达肿瘤表面抗原，那使用的抗体将不能识别这部分转化细胞。

2. 放射性标记的抗体

放射性同位素标记的抗体既可用于肿瘤细胞的检测也可用于肿瘤细胞的杀伤。多种

化学技术用于将放射性原子结合到抗体或其他蛋白上。基于抗体的肿瘤检测要求使用能放射出 γ 射线（可以从身体里穿透出来）的放射性核素，亚稳态的锝（^{99m}Tc）或铟（^{111}In）是最为常用的放射性同位素。用平面 γ 照相机检测 γ 射线，从而确定肿瘤的有无和所在位置。

用于杀伤癌细胞的抗体通常用放出 β 射线（如^{90}Y）或 α 射线（如^{212}Bi或^{211}At）的同位素来标记。β 粒子能穿透几层细胞，通过放射线的电离效应将这些细胞杀死。α 粒子的作用路径较短，但每一次放射可能会杀死路径内的所有细胞。虽然紧邻肿瘤的正常细胞会受到照射，但抗体介导的靶向放射治疗能有效促进各种肿瘤的衰退。

3. 抗体-毒素耦联物

将毒素结合到抗肿瘤表面抗原抗体上可以使毒素靶向传递到肿瘤表面，在某些情况下抗体-毒素耦联物通过随后的内在化将毒素传递到细胞内。多种来源于植物或微生物的毒素用于结合到抗肿瘤表面抗原的抗体上，最常用的毒素有假单胞菌外毒素和蓖麻毒素的 A 链，其作用是阻止靶细胞的蛋白质合成，从而杀死它。

4. 抗体-酶耦联物

抗体与前体药物激活酶结合，并用于临床评价（图 6.6），这种靶向癌的化学治疗法称为抗体指导的催化作用（antibody-directed catalysis，ADC）或抗体指导的酶前体药物治疗（antibody-directed enzyme pro-drug therapy，ADEPT）。对酶的选择是基于它催化（无害的）前体药物成为杀细胞剂，碱性磷酸酶就是这样一个例子，它通过对鬼臼亚乙苷磷酸盐去磷酸化而将其激活。在临床上，先给予抗体-酶耦联物，使其在细胞表面聚集，之后再使用前体药物，随之药物就会在肿瘤表面活化。

6.2.6　治疗用抗体——初始效果令人失望

尽管当初对抗体给予厚望，但初期开发的许多治疗用单抗产品的临床效果令人失望，对这种使用传统杂交瘤技术生产的完整鼠源抗体所得到的令人失望的结果，可归结为多种重要因素（表 6.4）造成的，这些因素为：鼠单抗被宿主（人）免疫系统识别为外源物质；非常难以制备人源单克隆抗体；当鼠单抗用于人体时，不能引起恒定区正常介导的许多效应功能；关于某类型肿瘤表面可供选择识别的合适靶细胞表面标志物的资料不充分；半寿期短，人抗体（IgG）的血清半寿期可长达 23d，而鼠单抗在人体内的半寿期为 30～40h；完整抗体穿透肿瘤体的能力差；单克隆抗体的制备费时昂贵。在过去的数年里，随着技术的进步，当初的那些困难也得到了解决。

6.2.7　嵌合和人源化抗体

当鼠单抗应用到人体后，它自身的免疫原性是获得成功临床应用的最大障碍，它的使用刺激宿主（人）的免疫系统应答产生中和抗体，从而迅速消除单抗产品的治疗效用。

解决鼠单抗免疫原性的一个显而易见的方法就是开发和使用人源单抗，但这个工作非常困难，因为人的淋巴细胞难以和鼠骨髓瘤细胞系融合，而即使融合了，人的遗传组分最先丢失，而且所得到的杂交细胞相当不稳定。另外，不能用有毒或其他有害的抗原物质来免疫人体。采用像诸如 EB 病毒感染这样的方法来获取抗体产生细胞的企图也非常

令人失望。

基因工程技术提供了一个减少鼠源单抗先天免疫原性的最有效方法。初期基因操作集中在制备含有鼠可变区和人恒定区的杂合或嵌合抗体分子上，人们认为这种部分人源化的抗体与没改造的鼠单抗相比免疫原性将会非常低，而事实也是如此。然而，这种嵌合抗体仍然保留着鼠源序列的重要部分（完整的可变区）（图 6.3），而这部分序列仍然能诱导产生免疫反应。

鼠单抗的免疫原性可通过将编码母本单抗结合抗原的互补决定区（complementarity-determining regions，CDR）的序列移植到编码人抗体的 DNA 序列中而进一步得到降低，所获得的人源化单抗仅包含编码抗体高变区（抗原结合区）的鼠源序列（图 6.7），而其他序列则完全是人源的，当这种抗体应用到人体时将不会引起免疫反应，然而许多这样的人源化

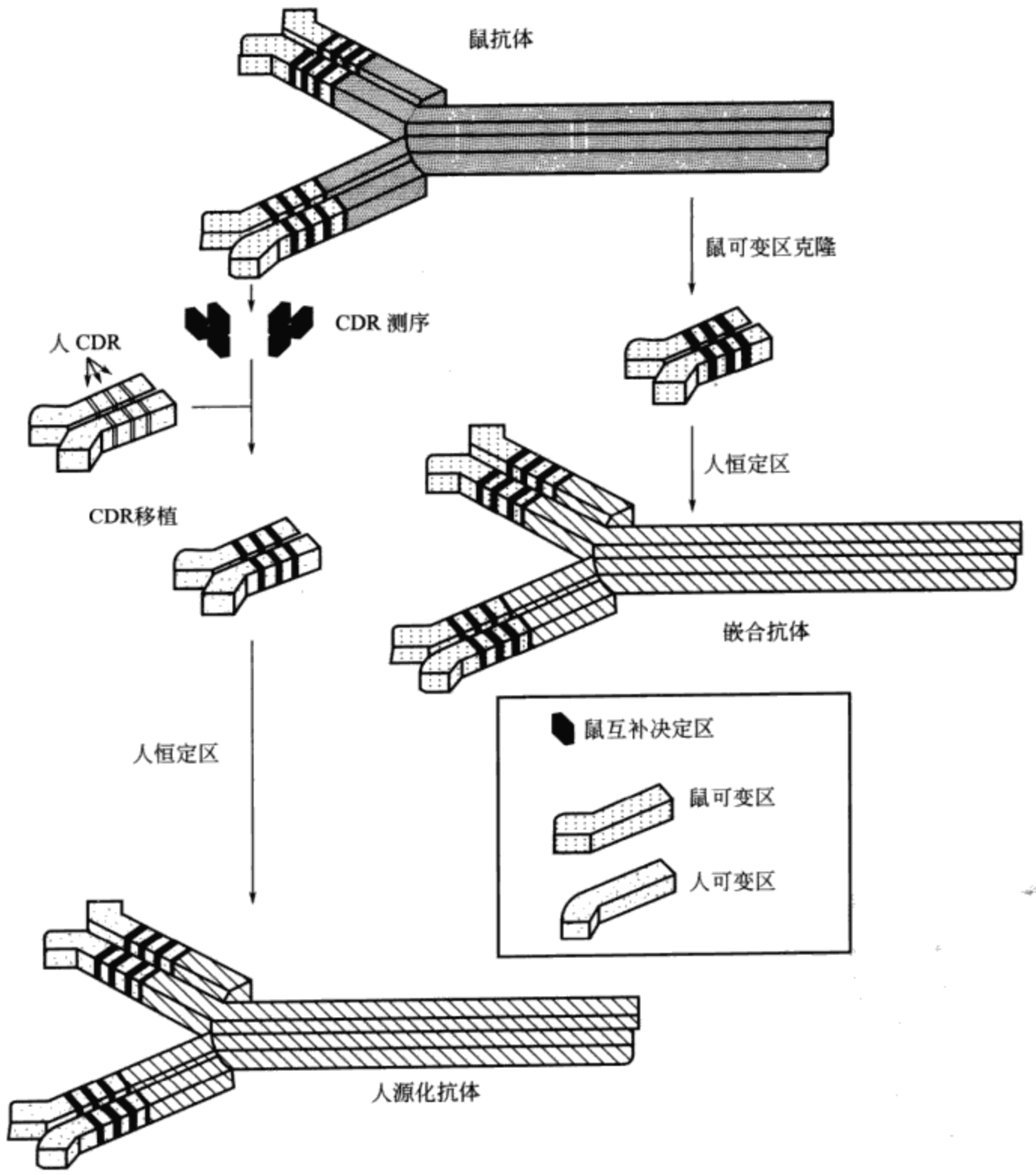


图 6.7　重组 DNA 技术使制备嵌合和人源化抗体成为可能

嵌合抗体由鼠源可变区和人源恒定区构成，它保留有较大成分的鼠源序列，当用于人体时通常保留有免疫原性。人源化抗体的免疫原性较低，因为它携带的鼠源序列仅是构成互补决定区的序列。首次报道于“New Scientist”（London）

抗体与母本鼠单抗相比显现出结合抗原亲和力的降低。在高变区周围的人框架区序列的微小改变通常能使结合抗原亲和力得到恢复，虽然可变链的框架区不直接参与抗原的结合，但能影响对抗原的结合。

人源化单抗的成功制备也克服了鼠单抗不能在受体病人体内介导一系列抗体效应的问题。抗体与抗原的结合通过许多方式促进了抗原的破坏和清除，抗体的结合使吞噬细胞更为有效地消化和破坏抗原，结合抗体的 Fc 区也激活补体。补体系统由许多血清蛋白组成，当它们激活后，可促进吞噬细胞对抗原的破坏，另外还直接促进侵入的微生物的裂解。鼠抗体的 Fc 段在人体内介导这种效应的能力很差，而人源化抗体的 Fc 段完全是人源的，因此不存在这种缺陷。

6.2.8　肿瘤表面抗原特异性

抗体介导的肿瘤检测和破坏的特异性完全取决于对仅在靶肿瘤细胞表达的肿瘤表面抗原的鉴定，但这种绝对的组织特异性在实际中是罕见的，许多肿瘤表面抗原在一种或多种健康细胞表面也有表达（都是比较低水平的表达），这些细胞也将成为抗肿瘤表面抗原抗体的靶子。另外，肿瘤分泌的部分肿瘤表面抗原以可溶形式进入到血流中，这些可溶的肿瘤表面抗原会将部分应用的抗体结合掉。此外，抗体会与那些包含肿瘤表面抗原类同结构的宿主抗原发生交叉反应。

癌胚抗原（原来描述为一种结肠直肠癌细胞相关的肿瘤表面抗原）就是这些困难的一个例证。一些乳腺癌和肺癌细胞也能表达癌胚抗原，而且一些哺乳期的乳腺非转化细胞以及结肠黏膜细胞也能低水平表达它。另外，合成癌胚抗原的细胞也能以可溶形式将部分该抗原分泌到血液中。然而，血清癌胚抗原水平的急剧升高并不一定预示着癌症，当病人发生诸如肠炎、肝硬化和肝炎等无关的疾病情况时癌胚抗原也能升高到这种水平。

尽管存在这些复杂因素，在某些情况下基于抗肿瘤表面抗原抗体的产品证明仍是有效的诊断和治疗制剂，然而临床上很少单独用于癌症的诊断和治疗，大多数基于抗体的癌症诊断制品都是与像超声波检查法等诊断指示器配合使用的。

6.2.9　应用于临床的抗体的制备

第一代单抗产品是采用杂交瘤技术制备的，然而最近批准的大部分产品是用重组技术制备的工程抗体。杂交瘤的制备使抗体产生细胞无限繁殖，而 DNA 技术则用于使抗体基因能无限扩增。嵌合或人源化抗体的发展并更进一步获准用于医疗，从而取代了最初采用传统杂交瘤技术获取的目标抗体制品的地位。通过对杂交瘤细胞的遗传学分析，可以获得编码重链和轻链可变区的精确核苷酸序列，将其拼接到编码（人）重链和轻链恒定区序列的前端就得到了嵌合抗体，而人源化抗体是用展现所需抗原结合特异性的（鼠）单抗的 CDR 序列替换人抗体的相应 CDR 序列而获得的。将构建好的基因导入动物细胞系内进行表达，以便于糖基化。大多数抗体分子在其 CH2 区糖基化（有些类型的抗体在其他恒定区也有糖基化位点）。虽然这种结合糖类的存在与否对抗体结合抗原的能力没有明显的影响，但如果抗体不能正常糖基化，则大多数抗体的效应功能会降低甚至丧失。除了影响效应功能外，抗体的糖基化状态还会影响其他特性，如溶解性和它在体内的降解速度。

有些情况下不必使用完整的抗体进行体内的诊断治疗，如用于体内肿瘤诊断目的的放射性标记的抗体，仅需要其在肿瘤部位聚集，抗体的结合能力在 Fab 段（图 6.3），这时抗体的恒定区就是多余的。因此，带有抗原结合位点的抗体片段也能满足这些用途。可以采用两种方式之一来获取抗体片段，用确定的蛋白水解酶与完整的抗体孵育可以得到 Fab 或 F(ab) 2 片段（图 6.3），再将其与 Fc 片段分开（如通过凝胶过滤层析）。

而更小的结合抗原的片段可以采用重组 DNA 技术制备。将展现所需结合特异性的抗体轻、重链可变区的核苷酸序列通过一段短接头序列连接起来，表达后就得到了 Fv 片段，它是由 V_H区和 V_L区通过短肽连接而成。Fv 片段可以用大肠杆菌来制备，因为其表达产物不需要翻译后的修饰。

抗体片段在抗体介导的实体瘤的诊断治疗上特别有用，因为其分子量小，比完整抗体更能有效穿透肿瘤体。

无论采用什么方法获得完整抗体或抗体片段的初级产品后，接下来就要采用适当的下游处理技术对其进行纯化。一般而言，纯化的产品以冻干形式上市。下面以单抗产品“Humaspect”为例说明其制备流程，见信息框 6.1。

信息框 6.1　实例研究——“Humaspect”的制备

Humaspect 是一个完整的人单克隆抗体，其与众不同之处是它由 EB 病毒转化的人源类淋巴母细胞系直接产生。在用于临床前，用锝（^{99M}Tc）标记。

Humaspect 与称为 CTA＃1 或 CTAA16.88 的细胞角蛋白瘤相关的抗原复合物特异结合，这些抗原与人大肠腺癌有关。该产品获准的治疗适应证是作为诸如超声波检查术或 CT 扫描等标准非侵入成像技术的辅助手段，用于对经组织学证实为结肠癌或直肠癌病人的复发或转移的成像检查。

Humaspect 的制备过程概述为如图 6.8。该过程从用中空纤维设计的生物反应器培养能产生抗体的类淋巴母细胞系开始，收获的抗体在不立即进行进一步处理时可以放置—70℃保存。

下游处理包括首先向抗体粗产品中加入 1% Triton-X-100，于环境温度下作用 1h，用以灭活任何潜在的脂质包裹的病毒污染。采用 G 蛋白亲和层析和离子交换层析等步骤以纯化抗体，之后加入磷酸钠缓冲液、氯化钠、乳糖等赋形剂，过滤除菌后无菌分装到制剂瓶中并冻干。该产品以试剂盒方式销售，盒中除了纯化抗体外还有交联剂，以便在临床应用前对抗体立即进行放射标记。

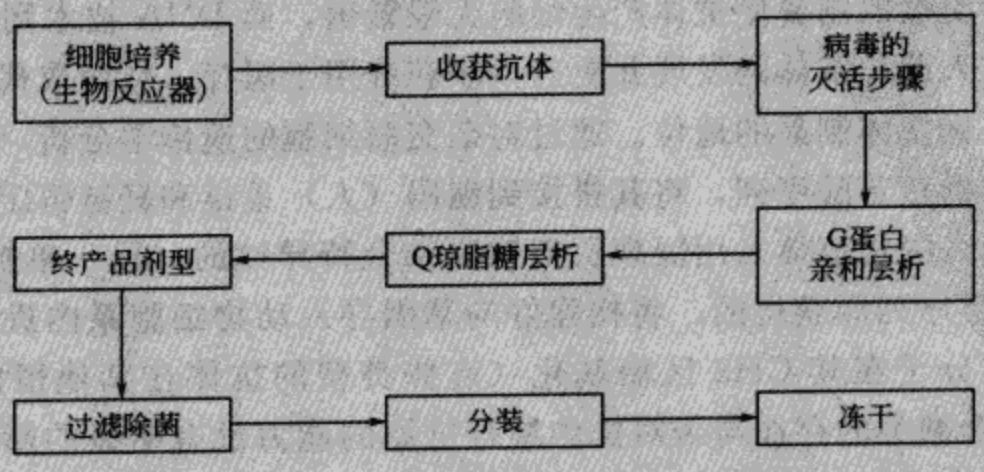


图 6.8

6.3　治疗用酶类

许多酶用于各种疾病的临床治疗（表6.4），其中几种酶［蛇毒去纤维酶、组织型血纤维蛋白溶酶原活化因子、尿激酶以及（活化形式的）凝血因子Ⅶ和凝血因子Ⅸ］在前面的章节中已经讨论过，这里不再赘述。下述多数酶制剂都是从原材料中直接提取的，但是近年来证实两种重组酶产品（DNA酶和葡糖脑苷脂酶）也具有医学用途。

表6.4　用于治疗目的的酶

酶	治疗方面的应用
蛇毒去纤维酶(丝氨酸蛋白酶)	抗凝血剂
组织纤溶酶原激活剂	溶解血栓剂
尿激酶	溶解血栓剂
(活化的)凝血因子Ⅶ和Ⅸ	凝血疾病的治疗
天冬酰胺酶	一些类型癌症的治疗
脱氧核糖核酸酶(DNA酶)	囊性纤维症的治疗
葡糖脑苷脂酶	Gaucher病的治疗
胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胶原酶	清创/抗炎剂
乳糖酶、胃蛋白酶、胰脂肪酶、木瓜蛋白酶	消化辅助剂
超氧化物歧化酶	预防氧毒性

6.3.1　天冬酰胺酶

天冬酰胺酶催化天冬酰胺水解成天冬氨酸和氨（图6.8），它是一个分子质量为130ku的四聚体，可从包括酵母、真菌和细菌如大肠杆菌等多种微生物中纯化出来。

所有细胞需要天冬酰胺维持正常的新陈代谢。虽然大多数人类细胞能自己合成这种氨基酸，但有些恶性细胞则丧失了该功能。血清中天冬酰胺的正常范围是0.5～1.5mg/100ml，当静脉内给予天冬酰胺酶时则血清天冬酰胺水平迅速降低，严重危及到不能自己合成天冬酰胺的恶性细胞内的蛋白合成，相反，非转化的体细胞则开始自己合成天冬酰胺（图6.8）。

临床使用的天冬酰胺酶通常是从大肠杆菌或菊花欧杆菌中纯化而来。大肠杆菌可产生两种天冬酰胺酶的同工酶，只有其中之一在临床上有效。重组DNA技术为从其他来源合成重组天冬酰胺酶提供了方便，而且有些显示出潜在的临床价值。天冬酰胺酶主要是用于治疗儿童某些类型的白血病，它的副作用包括严重的过敏反应、恶心、呕吐、发烧以及损伤肝肾功能等，这是因为当能从血液获得充足的天冬酰胺时，大多数非转化的体细胞不自己合成天冬酰胺，而当使用天冬酰胺酶时，血清天冬酰胺迅速降低，使这些健康细胞暂时丧失天冬酰胺供应，从而干扰蛋白质的合成，导致肝肾功能损伤等副作用。事与愿违的是，它也减缓了这些细胞为自己生成天冬酰胺所需的天冬酰胺

合成酶的合成（图 6.9）。

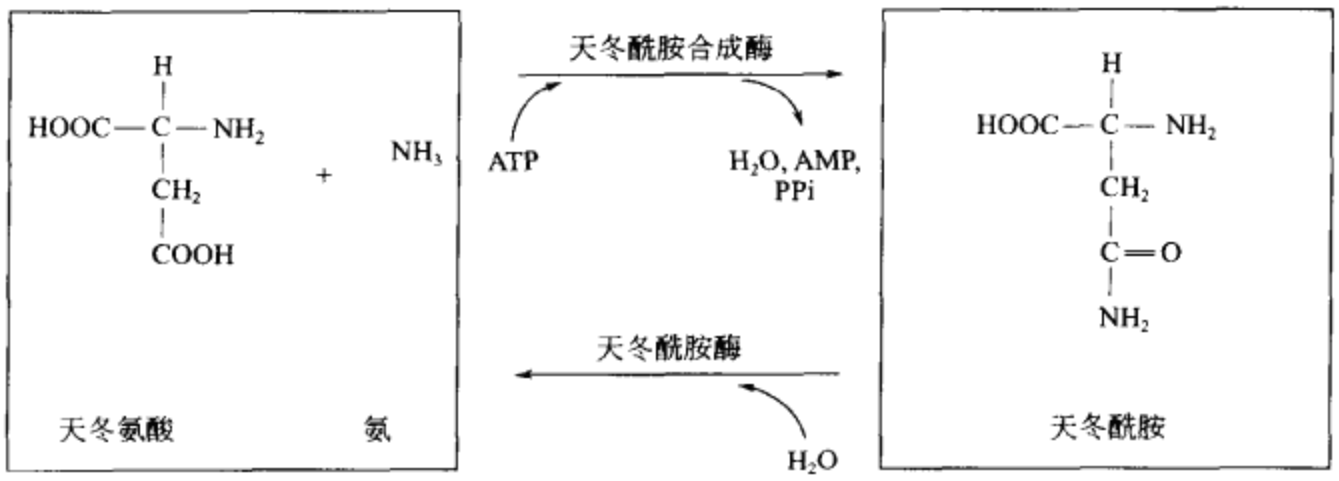


图 6.9 L-天冬酰胺的生物合成和降解

鉴于 *L*-天冬酰胺酶来源于微生物，当将其应用于人类会引起免疫反应则毫无惊奇可言，但这明显限制了该酶的长期临床功效。将这种 L-天冬酰胺酶与聚乙二醇耦联后，显示其免疫原性显著降低甚至丧失，现已经开始利用耦联了聚乙二醇的天冬酰胺酶用于临床研究。

6.3.2 清创和抗炎制剂

有些酶类被用作清创剂，它通过将异物和周围死亡组织清除从而使开放性伤口得到有效清理，这有利于伤口的快速愈合。诸如胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和胶原酶等常用作清创剂，一般情况下都是在受伤部位应用。

胰蛋白酶是哺乳动物胰腺合成的一种蛋白水解酶，分子质量为 24ku，当肽键的羧基是由精氨酸或赖氨酸残基提供时，它可水解该肽键。

木瓜蛋白酶是从番木瓜树的树叶和未成熟果实中分离的一种蛋白水解酶，它催化含有诸如赖氨酸、精氨酸和组氨酸等碱性氨基酸的肽键的水解。除用作清创剂外，木瓜蛋白酶还用作肉的嫩化剂和使饮料清澈（见第 11 章）。

木瓜凝乳蛋白酶作为从番木瓜树制备的另一种蛋白水解酶，也有医学应用价值。化学核溶解法是指通过将木瓜凝乳蛋白酶注射到损伤的椎间盘来治疗坐骨神经痛的术语。坐骨神经痛是一种以背部和腿的疼痛为特征的疾病，由椎间盘的退行性病变而致病。椎间盘往往是横向突出，从而压迫脊髓根神经元。注射木瓜凝乳蛋白酶似乎加速了椎间盘的退行性病变过程，因而更快达到稳定和无症状的终结状态。

胶原酶是一种催化胶原水解的酶，虽然从各种动物细胞的培养提取物中都能分离到，但通常是从各种梭菌的培养上清液中获取的。有些种类的梭菌具有致病性，可引起气坏疽。这些微生物产生诸如胶原酶等组织降解酶的能力便于它们在机体内的快速传播。

已经证实一些酶的使用有助于降低各种炎症反应，这类酶包括胰凝乳蛋白酶和菠萝蛋白酶。胰凝乳蛋白酶是一种由哺乳动物胰腺产生的酶原状态的蛋白水解酶，胰凝乳蛋白酶原在小肠里转变为胰凝乳蛋白酶，从而发挥功能，催化食物中蛋白质的水解。菠萝蛋白酶是从菠萝的果实或树干中纯化出来的植物蛋白酶。胰凝乳蛋白酶和菠萝蛋白酶抗炎效应的分子机制还没有完全阐明，其作用方式可能集中在它们能将蛋白质类炎症因子或促进炎症因子合成的

蛋白质进行降解。

6.3.3　辅助消化的酶类

许多酶制剂可用作消化辅助剂，大多数这样的酶是解聚酶，催化食物中的多糖、蛋白质和脂肪等成分的酶解。有些酶制剂仅包含催化特定食物成分降解的一种酶，而其他酶制剂包含多种酶活性，从而表现出广泛的消化能力。

α-淀粉酶催化 α1→4 糖苷键的水解，该键是淀粉或糖原等糖类中葡萄糖单体间主要的共价连接。由枯草芽孢杆菌或曲霉等微生物产生的 α-淀粉酶有着广泛的工业用途，将在第 11 章进行讨论。淀粉酶在高等动物中也起着重要的消化作用，从唾液或胰腺中可以分离出淀粉酶，而且多种淀粉酶制剂已经作为口服用药来辅助消化食物中的糖类。

乳糖酶催化乳中的主要糖类——乳糖的水解，生成葡萄糖和半乳糖。乳糖酶制剂可用于辅助消化，特别是用来减轻与乳糖不耐受性相关的症状。虽然大多数婴儿具有高水平的小肠乳糖酶活性，而许多地域的成人的乳糖酶活性则大大降低了，这些人不能消化乳糖，经常遭受食用牛乳后的肠部不适。

包括木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和胃蛋白酶等多种蛋白水解酶也能用作消化辅助剂。大多数动物的胃能自然地分泌胃蛋白酶，从而催化食物中蛋白质的水解。用作消化辅助剂的胃蛋白酶制剂是从多种屠宰场动物的胃黏膜中提取出来的。

临床应用的一些酶制剂含有多种酶活性。例如胰酶，是从胰腺提取的蛋白质类制剂，它含有淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶和核酸酶活性，而且可以口服用来治疗胰腺酶分泌不足导致的疾病，这些疾病包括慢性胰腺炎、胰腺癌和囊性纤维症。胰酶（以及许多其他酶类消化辅助剂）表现出其活性与 pH 值相关，它们在小肠的前段（十二指肠）活力最好。当口服使用这些酶时，必须通过胃才能到达作用部位，其中大部分在胃中被灭活了，一是因为这里的低 pH 值，再者可能受到了胃蛋白酶的催化水解（胃每天分泌大约 2L HCl，pH 值可达到 2 以下）。采取了许多策略来尽量减少胃的灭活，最简单的方法就是与胃酸分泌抑制剂（如甲腈咪胺）共同服用。但是，这些制剂在降低游离酸水平的同时也降低了胃蛋白酶的活力，而且更为严重的是它危及到低 pH 值对细菌的自然杀伤能力（在胃中低 pH 值可自然地杀死食物来源的微生物）。使用这类酶的另一种方法是采用肠溶性包裹的片剂或胶囊方式（肠溶性包裹层不受酸的影响，但在比较中性的 pH 值时能溶解，这正符合十二指肠的特性）。处于研究中的另一方法是使用微生物（主要是真菌）来源的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶，与来源于胰腺的酶相比，许多微生物来源的酶表现出更强的酸稳定性。胰脂肪酶是来源于胰腺组织的另一个酶制剂，它也能用作消化辅助剂，主要含有脂肪酶活力。

6.3.4　超氧化物歧化酶

超氧化物歧化酶催化高反应性的过氧化物离子（O_2^-）转变为过氧化氢（H_2O_2）。由于过氧化物离子具有高反应性，并能导致细胞的严重损伤，因此超氧化物歧化酶在所有需氧的生物体中具有重要功能。在正常新陈代谢活动中，需氧生物体通常将氧分子直接生成水来减

少氧的量，这个反应如下所示，需要 4 个电子：

$$O_2 + 4e^- + 4H^+ \longrightarrow 2H_2O$$

氧分子的不完全氧化总是生成诸如过氧化物（O_2^-）、过氧化氢（H_2O_2）或羟基离子（O^-）等分子，它们都有很强的反应性。过氧化氢和过氧化物基团通过与膜上的不饱和脂肪酸发生反应而引起广泛的细胞损伤。几个细胞内的酶能产生 O_2^- 和 H_2O_2，此外，存在于血红蛋白等多种分子中的铁原子在自然氧化时也能产生这些反应性分子。有两种特定的酶可保护细胞免受过氧化物和过氧化氢的损伤，过氧化物歧化酶催化过氧化物转变为过氧化氢，如下式所示：

$$O_2^- + O_2 + 2H^+ \xrightarrow{\text{过氧化物歧化酶}} H_2O_2 + O_2$$

之后过氧化氢酶催化过氧化氢生成氧气和水，如下式所示：

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{过氧化氢酶}} 2H_2O + O_2$$

在真核细胞内发现有两种形式的过氧化物歧化酶。细胞质内的酶是由两个相同的亚基组成的双体，分子质量为 31ku，每个亚基含一个锌原子和一个铜原子，两种金属原子直接参与酶促反应。而与线粒体有关的歧化酶的分子质量为 75ku，带有两个锰原子。在需氧原核生物中也发现了两种高度同源却又有明显差别的超氧化物歧化酶，一种含锰，而另一种含铁。

从牛的肝脏和红细胞中分离的超氧化物歧化酶已经应用许多年了，而且一直作为抗炎剂用于临床。人超氧化物歧化酶已被在多种重组体系中以异源蛋白的形式制备出来，现在这些制剂正进行临床试验，以评估其对血氧过高所致组织损伤的防护能力。

6.3.5 囊性纤维症的核酸酶治疗

囊性纤维症是一种最常发的遗传性疾病，种群不同发病率也不一样，以北欧人发病率最高，在这些人中大约每 2500 个新生儿就有一例发病。许多年以来人们已经知道囊性纤维症患者从汗中丢失了过多的盐分，最近从病人体内鉴定出了缺陷基因。该基因编码一个通常作为氯化物通道的多肽，因此囊性纤维症的根本病因可能是离子转运出现了故障。大约 5%的白人携带这种缺陷基因，然而这种性状是隐性的，只有当一个人遗传有来自父母双亲的缺陷基因时才会发病。这些个体内异常基因的表达导致包括胰腺和汗腺在内的多种组织的功能受损。毫无疑问，囊性纤维症的主要临床症状是呼吸道里产生了非常黏的黏液，由此危及到肺脏的功能。

囊性纤维症患者体内离子转运的改变似乎引起了肺生理学的微妙变化，从而导致细菌的反复感染，而感染又引起免疫反应的发生，吸引大量的嗜中性粒细胞聚集到感染部位，这些白细胞将细菌消化分解后释放出大量的 DNA，而这些释放出来的 DNA 又与存在于受感染肺部的另外的细胞外物质相互作用，从而形成了高黏性的黏液。

为防止黏液的形成，遭受细菌感染的囊性纤维症病人通常接受轻打按摩疗法。长时间地敲打病人的胸部使黏液移动，患者从而将其排出体外。据推测多年前使用 DNA 酶制剂来治疗肺部感染正是考虑到它能减轻呼吸症状，因为该酶通过催化细胞外 DNA 的降解从而促进黏液黏性的降低。

DNA 酶 I 是最主要的、特性明确的 DNA 酶家族成员之一，这种核酸内切酶催化 P-O(3) 间磷酸二酯键的水解（图 6.10）。虽然它能比较慢地降解单链 DNA，但它的最适底物

是双链 DNA。20 世纪 40 年代后期，首先从胰腺提取物中初步提纯牛 DNA 酶 I，通过随后数十年的实验，清晰地说明它具备在体外显著降低囊性纤维症患者肺黏液的黏性的能力，而且 20 世纪 50 年代牛胰腺 DNA 酶在美国获准用于囊性纤维症的治疗。开始时能很好地耐受，但长期使用则出现了副作用，部分是因为它是牛源的（在人体内具有免疫原性），但主要原因可能是产品中存在蛋白水解酶污染（随后的检测证实这些制剂中含高达 2%的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶）。

20 世纪 80 年代首次从胰腺的 cDNA 文库中分离到编码人 DNA 酶 I 的核苷酸序列，它编码一个 260 个氨基酸的糖蛋白，与牛 DNA 酶 I 高度同源（同源性为 77%）。其 cDNA 在重组 CHO 细胞中获得了表达，所制备的 DNA 酶（商品名为“Pulmozyme”）已获准用于医学用途。

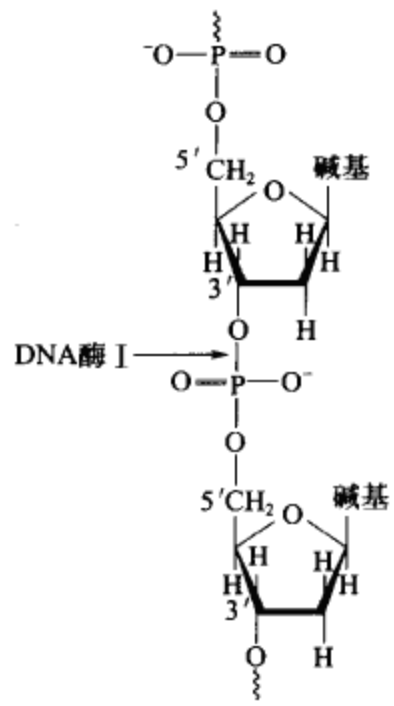


图 6.10　DNA 酶 I 对 DNA 的剪切水解成两部分，一部分带有游离 3′-羟基末端，另一部分带有游离 5′-磷酸末端

6.3.6　葡糖脑苷脂酶

戈谢病（Gaucher's disease）是由于糖基化的葡糖脑苷脂酶的缺乏而引起的一种遗传性代谢病，像囊性纤维症一样，它也是隐性遗传的。葡糖脑苷脂酶的天然底物是葡糖脑苷脂，它是少量存在于某类细胞中的一种糖脂类物质，当该酶缺乏时会特征性地导致这些脂类在细胞内的积聚，特别是在巨噬细胞内的积聚。戈谢病的临床表现包括器官肿胀（因为受侵袭的巨噬细胞聚集于此）、贫血、骨痛，有时还有神经损伤。

戈谢病能用酶替代法来治疗，从人胎盘中纯化的葡糖脑苷脂酶可用于这种目的，一般每两周给患者静脉注射一次。当静脉用药时，部分酶被巨噬细胞吸收了，因为巨噬细胞表达多种细胞表面外源凝集素，而外源凝集素能强烈结合各种糖蛋白，产生的复合物常常通过胞饮机制而内在化。考虑到花费、来源的可用性以及偶尔发生疾病的传播等因素，从而促进了重组葡糖脑苷脂酶产品的开发。1994 年一种商品名为“Cerezyme”的重组制品（用 CHO 工程细胞制备）获准用于常规医疗。

6.4　进一步的阅读材料

图书

Aslam, M. (1997) *Bioconjugation*. MacMillan Press, Basingstoke.

Bland, J. (1986) *Digestive Enzymes*. Keats Publishers, New Canaan.

Essand, M. (1995) *Radioimmunotargeting of Cancer Cells*. Acta Universitatis Upsaliensis, Upsaala.

George, A. (2000) *Diagnostic and Therapeutic Antibodies*. Humana Press, New York.

Goding, J. (1996) *Monoclonal Antibodies*. *Academic Press*, London.

Gosling, G. (1993) *Immunotechnology*. Portland Press, London.

Grossbard, M. (1998) *Monoclonal Antibody-based Therapy of Cancer*. Marcel Dekker, New York.
King, D. (1998) *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*. Taylor & Francis, London.
Lauwers, A. & Scharpe, S. (1997) *Pharmaceutical Enzymes*. Marcel Dekker, New York.
McCafferty, J *et al*. (1996) *Antibody Engineering*. IRL Press, Oxford.
Nezlin, R. (1998) The *Immunoglobulins*. Academic Press, London.
Oxender, D. (1999) *Novel Therapeutics from Modern Biotechnology*. Springer-Verlag, Godalming.
Shepard, P. (2000) *Monoclonal Antibodies*. Oxford University Press, Oxford.

论文

抗体

Ansell, P. (2000) Hybridoma technology: a view from the patent arens. *Immunol. Today* **21** (8), 357-358.
Choy, E. *et al*. (1995) Therapeutic monoclonal antibodies. *Br. J. Rheumatol.* **34**, 707-715.
Clark, M. (2000) Antibody humanization: a case of the Emperor' s new clothes? *Immunol. Today*. **21** (8), 397-402.
Farah, R. *et al*. (1998) The development of monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Exp*. **8** (3&4), 321-356.
Fischer, R. *et al*. (2000) Antibiotic production by molecular farming in plants. *J. Biol. Regulators Homeos. Agents* **14** (2), 83-92.
Harris, W. (1994) Humanizing monoclonal antibodies for *in vivo* use. *Anim. Cell Biotechnol*. **6**, 259-277.
Hudson, P. (1998) Recombinant antibody fragments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 395-402.
Hudson, P. (1999) Recombinant antibody constructs in cancer therapy. *Curr. Opin. Immunol.* **11** (5), 548-557.
Hudson, P. (2000) Recombinant antibodies: a novel approach to cancer diagnosis and therapy. *Exp. Opin. Invest. Drugs*. **9** (6), 1231-1242.
Little, M. *et al*. (2000) Of mice and men: hybridoma technology and recombinant antibodies. *Immunol. Today* **21** (8), 364-370.
Multani, P. & Grossbard, M. (1998) Monoclonal antibody based therapies for hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* **16** (11), 3691-3710.
Pluckthun, A & Pack, P. (1997) New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments *Immunotechnology* **3**, 83-105.
Russell, C. & Clarke, L. (1999) Recombinant proteins for genetic disease. *Clin. Genet.* **55** (6), 384-389
Stein, K. (1997) Overcoming obstacles to monoclonal antibody product development and approval. *Trends Biotechnol*. **15**, 88-90.
Verma, R. *et al*. (1998) Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mamallian expression systems. *J. Immunol. Methods* **216**, 165-181.

治疗用酶

Estlin, E. *et al*. (2000) The clinical and cellular pharmacology of vincristine, cortosteroids, L-asparaginase, anthracyclines and cyclophosphamide in relation to childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **110** (4), 780-790.
Koch, C. & Holby, N. (2000) Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Respiration* **67** (3), 239-247.
Liang, L. & Yang, V. (2000) Biomedical applications of immobilized enzymes. *J. pharm. Sci.* **89** (8), 979-990.
Mates, J. *et al*. (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **32** (8), 595-603.
McIntyre, A. (1999) Dornase alpha and survival of patients with cystic fibrosis. *Hosp. Med.* **60** (10), 736-739.
Pui, C. (2000) Acute lymphoblastic leukaemia in children. *Curr. Opin. Oncol.* **12** (1), 3-12.

(高荣凯　译　　苏国富　校)

第7章

激素和生长因子在医疗中的应用

7.1 引　　言

目前，一些激素制剂已应用于临床诊断数十年了，也有一些（如肾上腺素、多肽激素、类固醇激素）将要合成，用于医疗的蛋白激素（至少在开始的时候）直接来源于动物，由此而产生的一些问题包括疾病的传播，促进了合成蛋白激素的发展（表 7.1）。此外，蛋白质

表 7.1　目前批准医用的重组激素药物

产　品　名	简　　介	应 用 对 象	首次批准日期(国家或地区)
胰岛素			
Humulin	重组人胰岛素	糖尿病患者	1982(美国)
Novolin	重组人胰岛素	糖尿病患者	1991(美国)
Humalog	改构重组人胰岛素	糖尿病患者	1996(美国,欧洲)
Liprolog	改构重组人胰岛素	糖尿病患者	1997(欧洲)
Insuman	重组人胰岛素	糖尿病患者	1997(欧洲)
NovoRapid	改构重组人胰岛素	糖尿病患者	1999(欧洲)
胰高血糖素制品			
Glucagen	重组人胰高血糖素	低血糖患者	1998(美国)
注射用胰高血糖素	重组人胰高血糖素	低血糖患者	1998(美国)
生长激素			
Protropin	重组人生长激素	儿童生长激素缺乏	1985(美国)
Humatrope	重组人生长激素	儿童生长激素缺乏	1987(美国)
Nutropin	重组人生长激素	儿童生长激素缺乏	1994(美国)
Biotropin	重组人生长激素	儿童生长激素缺乏	1995(美国)
Genotropin	重组人生长激素	儿童生长激素缺乏	1995(美国)
Norditropin	重组人生长激素	儿童生长激素缺乏	1995(美国)
Nutropin AQ	重组人生长激素	儿童生长激素缺乏	1995(美国)
Saizen	重组人生长激素	儿童生长激素缺乏	1996(美国)
Serostim	重组人生长激素	儿童生长激素缺乏	1996(美国)
促性腺激素			
Gonal F	重组人卵泡刺激激素	停止排卵,排卵过度	1995(欧洲)
Puregon	重组人卵泡刺激激素	停止排卵,排卵过度	1996(欧洲)
红细胞生成素			
Epogen	重组人红细胞生成素	贫血症	1989(美国)
Procrit	重组人红细胞生成素	贫血症	1990(美国)
Neorecorman	重组人红细胞生成素	贫血症	1997(欧洲)

工程的发展使合成多肽激素的类似物更为简便，数种蛋白质工程产品已获得应用的许可，最广泛应用的多肽激素为胰岛素，其次为胰高血糖素、人生长激素、促性腺激素、促红细胞生成素，这将是本章论述的主要内容。

最近，许多具有临床应用前景的生长因子已研制成功（表 7.2），重组促血小板生长因子是其中第一个获得许可的产品（在 1997 年用于治疗糖尿病溃疡），但更多的生长因子产品还仅应用于诊断。关于这些问题将于本章的最后一节讨论。

表 7.2 已批准或正在进行临床试验的重组生长因子

生长因子	应用	进展
血小板源生长因子	糖尿病/皮肤溃疡	疗效已证明
胰岛素样生长因子	肌萎缩性(脊髓)侧索硬化，烧伤，骨折，Ⅱ型糖尿病	研究中
转化生长因子	糖尿病脚部溃疡，受损部位愈合	研究中
表皮生长因子	外伤治疗，皮肤溃疡，角膜/白内障手术	研究中
血管内皮生长因子	心血管失调，冠心病	研究中
角化细胞生长因子	伤口治疗，多种皮肤病	研究中
神经生长因子	糖尿病外周神经病变，肌萎缩性(脊髓)侧索硬化，多种神经性疾病	研究中
成纤维生长因子	慢性软组织溃疡，腿脚部溃疡，静脉淤血	研究中

7.2 胰岛素

胰岛素是一种由位于胰岛的郎格罕 β 细胞产生的多肽激素，它于 1921 年被首次分离成功，氨基酸序列在 20 世纪 50 年代后期确定。其对代谢产生广泛的影响。在糖代谢中发挥着中心调节作用。在蛋白质和脂类代谢中也发挥了重要的作用。胰岛素的产生水平由血液中的葡萄糖含量决定。葡萄糖水平的升高导致胰岛素分泌量的增加，使组织（主要是肝脏，其次是肌肉）对血糖的代谢水平升高，当血糖水平恢复正常，则胰岛素的分泌也降低。

7.2.1 糖尿病

在人体内，由于无法产生胰岛素而导致了糖尿病的发生（Ⅰ型糖尿病），它是一种以血糖水平增加而尿糖增加为特征的慢性疾病，同时伴有糖原分解、糖异生和脂肪酸氧化水平的提高及尿素产生的增加，与此同时，在外围组织中脂肪酸和蛋白质的合成、葡萄糖的代谢水平降低。世界范围内有 1200 万糖尿病患者，并直接导致每年 60 万人死亡。糖尿病的直接原因是由于产生胰岛素的 β 型胰细胞的不可逆转的损伤。尽管自动免疫系统疾病、病毒感染、基因都可能是诱发因素，但对其机理还没有充分了解。糖尿病可以通过胰岛素制剂的经胃肠道给药加以控制，仅在胰岛素得到分离后的一年，1922 年即用于治疗糖尿病。

7.2.2 胰岛素的体内合成

胰岛素在体内最早以前胰岛素原合成于胰岛 β 细胞（图 7.1），该分子包括 23 个氨基酸的末端信号序列，它指导蛋白质通过内质网膜到达内质网的内腔，在内质网的内腔该前导序列由一个特殊的信号肽从前胰岛素原上切除，产生前胰岛素。含前胰岛素的小泡从内质网中

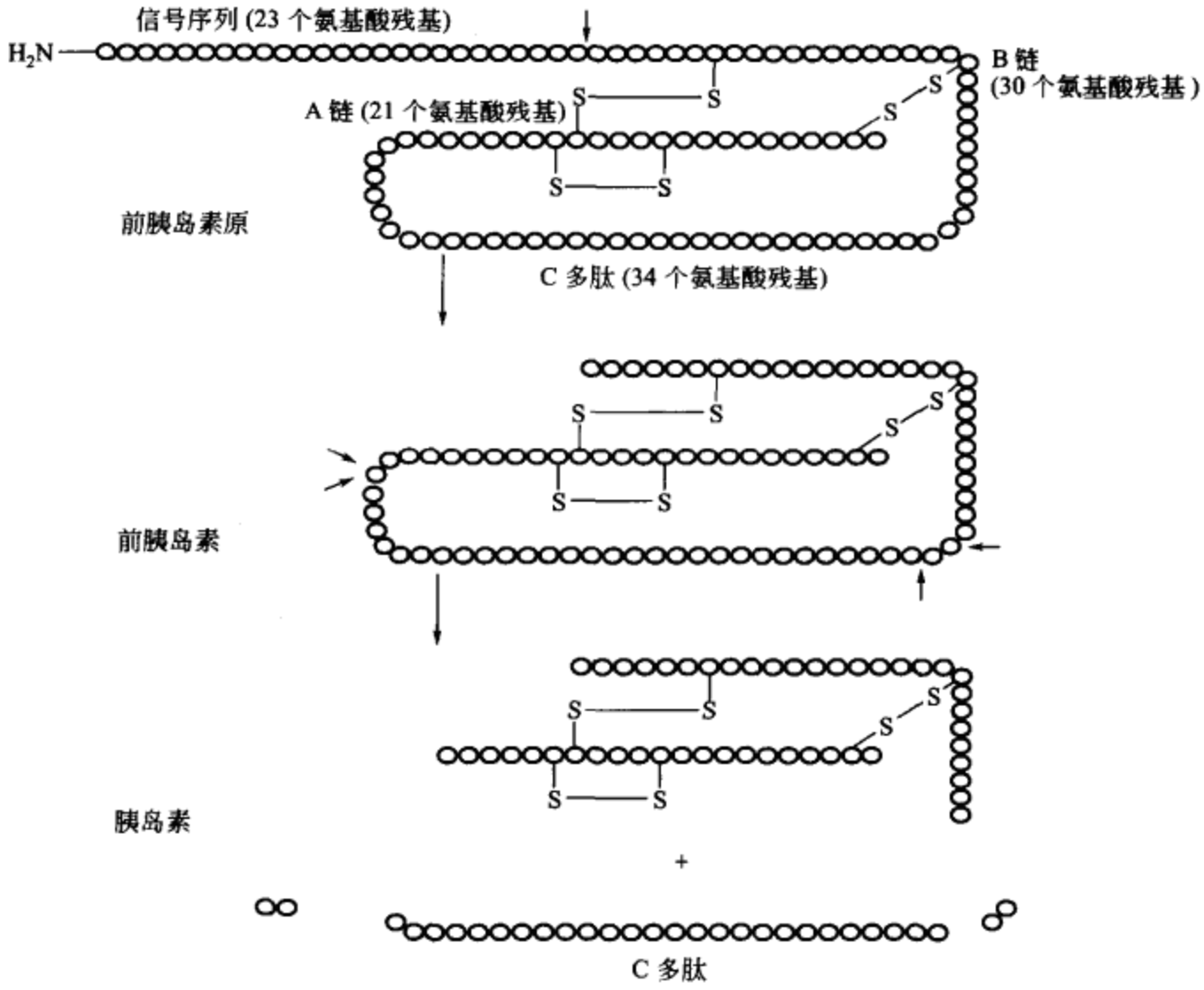


图 7.1　在体内由前胰岛素原合成人胰岛素

合成过程包括在前胰岛素原中 N 端 23 个氨基酸的信号序列去除，产生了前胰岛素，在前胰岛素转变为胰岛素的蛋白水解过程中，同时产生了 30 个氨基酸残基的序列（C 多肽或连接多肽）和两个二肽。成熟的胰岛素由 A 和 B 两条多肽链组成，B 链含有 30 个氨基酸残基，它们通过两条链间二硫键连接。在 A 链内还存在着一个链内二硫键连接

溶入高尔基体的膜结构中。随后从高尔基体中出来。因为它们的外表面由网格蛋白所包被，这些小泡通常称为包裹型分泌小泡。当它们离开高尔基体后。这些小体失去了网格蛋白，变成了非包被的分泌颗粒。

前胰岛素转变为胰岛素发生于包被分泌性小体，这个过程包括前胰岛素分子的蛋白裂解，产生成熟的胰岛素的 C 端和连接多肽，这个成熟的胰岛素由两个多肽链通过两个二硫键连接组成，分子质量约为 5.8ku，A 链含有 21 个氨基酸残基，B 链含有 30 个氨基酸残基。A 链含有一个链内二硫键连接。在前胰岛素转变为胰岛素的过程中产生一个多肽链能将前胰岛素的 A 链和 B 链连接起来。在形成成熟的胰岛素之前，两个二聚体多肽在这个连接小肽的末端彼此分开，同时产生一个短的多肽链，称之为 C 多肽或连接多肽。

除了成熟的胰岛素，分泌性颗粒也含有少量的前胰岛素的 C 多肽及前胰岛素原的氨基酸，非分泌性细胞作为一个胰岛素在 β 细胞内的储备库，其正常的储藏形式为六聚体，由两个锌原子加以稳定。加入少量的锌可使纯化的胰岛素形成胰岛素六聚体。分泌性颗粒通过胞吐作用将其内容物释放到血液中去。此过程是在特殊的分泌信号刺激下引发的，例如血液中葡萄糖浓度的升高。

由不同种属动物获得的胰岛素是相似的，但它们的氨基酸序列不是完全一致。大鼠和小鼠合成的胰岛素氨基酸序列有轻微的差异。猪胰岛素与人胰岛素在其B链的C末端仅相差一个氨基酸残基。牛与人相差3个氨基酸，而羊差4个氨基酸。而其C多肽，在不同的种属之间相差非常显著。

7.2.3 常规胰岛素制剂

针对于糖尿病人使用的胰岛素制剂从前都是直接来源于屠宰的健康动物胰腺，如猪和牛。由于猪的胰岛素在氨基酸序列上与人更为相似，猪胰岛素比牛胰岛素更具有一些治疗优势。因为这将减少一些免疫反应。

纯化的胰岛素最早应用于治疗是在20世纪20年代早期，是通过应用酸-乙醇沉淀法从猪或牛的胰脏获得的，但其成分还不够纯。尽管胰岛素被结晶于1926年，但人们当时对其晶体化的过程了解还不多。研究者发现从粗提物中连续地结晶胰岛素是不可能的。直到1934年，人们才发现锌能够促进胰岛素的结晶，使生产者能够提高从胰腺组织的粗提物中获得胰岛素晶体的产量。获得的晶体通过再结晶的过程使胰岛素得到进一步的纯化，这种胰岛素被称作常规胰岛素。尽管反复的纯化使胰岛素的纯度得到了较大的增高，但以现代的标准来看，它的纯度还是不够的。

就常规胰岛素本身而言，它也含有不同种形式的胰岛素分子，如精酸胰岛素、脱酰胺胰岛素、胰岛素酯及胰岛素二聚体等。脱酰胺胰岛素和烷基化形式是在其酸-醇提取过程中形成的。在提取环境中精酸的基部分可能被二聚化。也可能含有胰岛素原及其他的多肽，如血管活性肠肽（vasoactive intestinal peptide，VIP）、抑生长激素和胰高血糖素。尽管重结晶过程能有效地去除大分子物质，但一些大分子的蛋白质碎片偶尔也被分离出来。

在常规胰岛素制剂中出现污染物会降低终产品中的胰岛素含量，导致它的临床用量复杂。人们为了降低对胰岛素蛋白的水解而将其保存于酸性环境中，这种环境也同时保存了具有蛋白酶活性污染物的蛋白酶活性。污染物同时也具有免疫原性，当一个糖尿病人为了延续其生命而不得不每天数次大量注射胰岛素时，这个问题变得非常严重。反复的用药必定导致严重的免疫反应。即使轻微的免疫反应也会导致在注射点周围组织发生炎症反应而坏死。

当胰岛素来源于牛或猪并应用于人时，免疫反应会很轻微。然而，这种胰岛素的使用却能刺激病人产生抗胰岛素抗体，为了维持疗效，这种中和性抗体的出现必然导致用药剂量的不断增加。同时结合了抗体的胰岛素复合物延长了其降解周期。

7.2.4 层析法纯化的胰岛素

现在为了进一步减少常规胰岛素制剂中的污染物，经过再结晶的胰岛素制剂通常要再经过另外的层析纯化步骤。凝胶过滤是第一种用于进一步纯化胰岛素的层析技术，可有效地将高分子量的污染物从胰岛素中分离出来，如蛋白水解酶、前胰岛素、胰岛素二聚体。同污染物一同被洗脱的还包括可以降低胰岛素疗效的脱氨胰岛素和精氨酸胰岛素。而其他与胰岛素分子量相似的污染物如胰腺多肽用此方法是无法去除的。由于胰岛素从凝胶柱上洗脱产生了一个峰，所以通过此方法获得的胰岛素称为单峰胰岛素。

基于经济上的可行性，用来纯化再结晶胰岛素的凝胶过滤柱应该足够大。一些厂家基于这个目的生产了层叠柱系统（图 7.2）。图 7.2 所示过滤柱的总装载体积是 96L。每次可以用 2L 样品体积，从中获取 50g 纯化的再结晶胰岛素。一个单独的柱子运行需要近 7h。附加的层析步骤可以进一步降低纯化胰岛素制品中的污染物水平。因此离子交换层析柱经常用于大规模生产。

已经有人推荐胰岛素制剂中胰岛素原含量不应超过 10×10^{-6}，同时其中的胰多肽含量不应超过 1×10^{-6}。而且还推荐高分子聚集蛋白污染物的量不应超过 1/%。

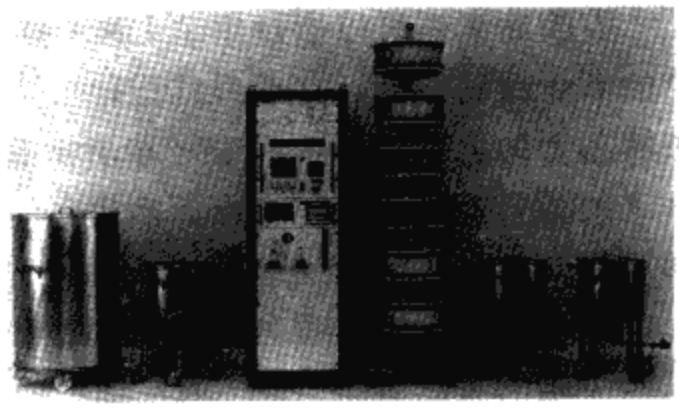


图 7.2　生产规模的胰岛素自动纯化系统

它具有每周生产 600g 重结晶胰岛素的能力。由左至右分别为：300L 不锈钢缓冲罐，50L 不锈钢锥形样品罐，操纵仪，六层叠柱以及两个收集罐。六层叠柱可以用三个柱一组分两部分并排放置（由 Pharmacia 公司供图）

7.2.5　人胰岛素制剂

在过去的 30 年已经发展了大批量生产人胰岛素的方法，其中一些方法，如直接化学合成胰岛素分子，虽可行，但在经济上不太具有吸引力。而其他方法仍然被证明是经济上具有可行性，理论上很合理，这些方法包括猪胰岛素酶切修饰，人胰岛素 cDNA 在重组微生物中的表达。

人胰岛素是在 20 世纪 70 年代早期第一个由猪胰岛素酶切修饰而获得的。人胰岛素和猪胰岛素区别在于一个单一的氨基酸。人胰岛素 B 链羧基末端（残基数 30）为苏氨酸，而猪胰岛素在这个位置是一个丙氨酸残基。用胰蛋白酶处理完整的猪胰岛素会导致 B 链 22 号残基和 23 号残基之间的蛋白水解断裂（另外还有 29 号残基和 30 号残基之间），有效地去除 B 链羧基末端的八肽。合成一条与人八肽一致的多肽序列，可以和这种经胰蛋白酶处理过的猪胰岛素连接。这个过程如图 7.3 所示，可以有效地将猪胰岛素转变成人胰岛素。利用这种方式获取的人胰岛素已经在临床上应用多年。

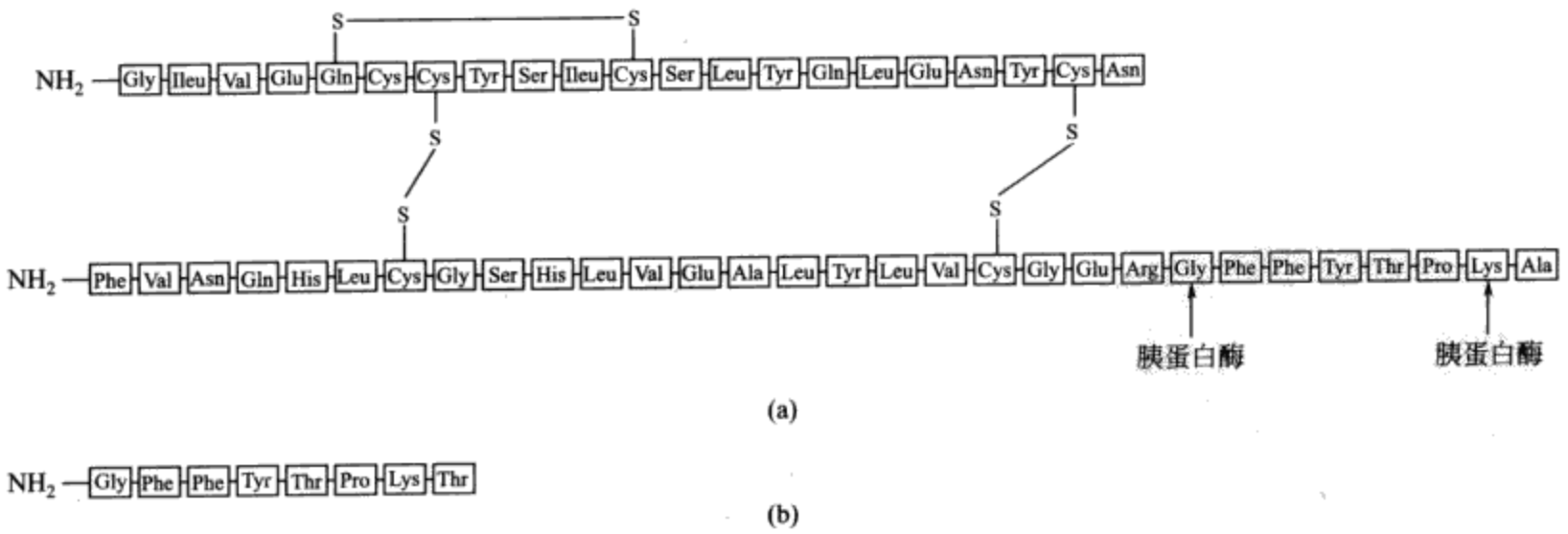


图 7.3　猪胰岛素的氨基酸序列

(a) 显示了胰蛋白酶的裂解位点。胰蛋白酶可有效地切去胰岛素 B 链羧基端的 8 个氨基酸，人胰岛素与猪胰岛素仅相差 1 个氨基酸。在猪胰岛素的 B 链第 30 位为 1 个甘氨酸残基，而人胰岛素在此位置为 1 个苏氨酸残基，所以人的胰岛素可以通过猪胰岛素来合成，即用胰蛋白酶将猪胰岛素 C 端的八肽去掉，而用合成的人胰岛素的八肽 [(b)] 取代

人胰岛素还可以通过重组 DNA 技术来获得。重组人胰岛素制品是第一种由这一技术生产的商业保健产品，并获准广泛地应用于临床。成功地从微生物中获取人胰岛素，保证了未来胰岛素的供给不再依赖于屠宰动物的胰腺组织的可行性。从一头猪的胰腺获取的纯化的胰岛素的量只能够满足一个糖尿病患者 3d 的需要。同时重组蛋白的产品还可以排除由感染的胰腺意外的将病毒传递给糖尿病患者的风险。

第一个由基因工程方法获得的胰岛素制品是通过将编码胰岛素 A 链和 B 链的 cDNA 插入到个别的大肠杆菌（*E. coli*）细胞（K12 株），然后 A 链和 B 链从不同的重组系统中纯化出来，再通过二硫键的形成而连接起来。人胰岛素还可以通过在 *E. coli* 中表达编码人胰岛素原的核苷酸序列而获得。胰岛素原分子进而可以通过酶切去除连接的肽转变成天然的胰岛素。与最初的在两个分离的生物反应器中分别生产两条胰岛素肽链的方法相比，这种生产方法已经应用得更普遍了。很大程度上是因为只通过一次发酵和接下来的纯化方案是必需的。现在重组人胰岛素已经在工业上应用 50000L 发酵罐进行大规模的生产。目前，人胰岛素已经可以从重组酵母系统中获取了。

虽然用重组方法得到的胰岛素与天然的激素是一样的，但重组产品中的任何杂质都是由微生物引起的，而不是动物器官。而且，现代蛋白质纯化方法可以将任何在终产品中可以发现的杂质降低到最低水平。胰岛中产生胰岛素的 β 细胞岛不到整个胰腺组织的 1%，所以从动物得到的胰岛素提取物在纯化之前当然也会被非胰岛素蛋白杂质严重污染。

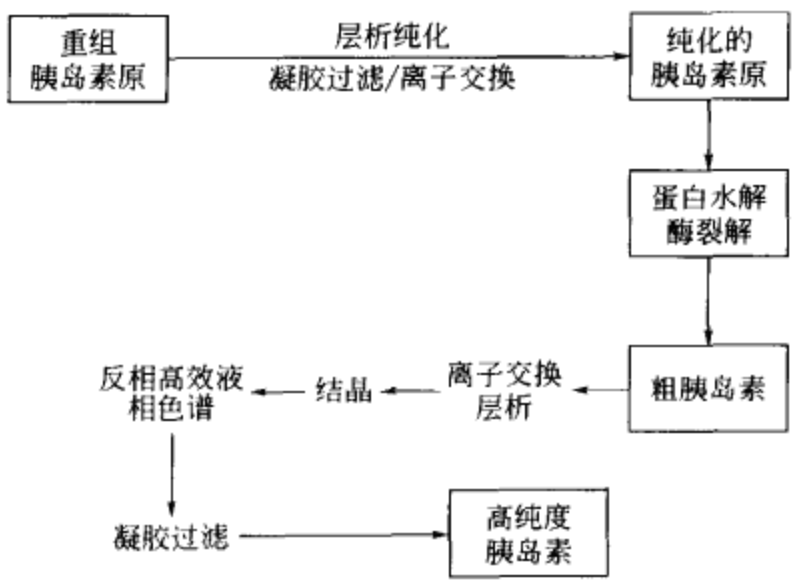


图 7.4

在大肠杆菌中产生的胰岛素是胰岛素原，首先通过层析纯化，随后在蛋白酶作用下裂解为胰岛素。在通过离子交换层析和结晶过程后，将晶体溶解通过 HPLC 柱，经过凝胶过滤后产生最终的产品

一些其他技术可能被用来进一步提高胰岛素制品的纯度，包括疏水反应层析和反相高效液相色谱（reverse-phase-HPLC，RP-HPLC）。已经在第 3 章讨论过，这些附加的技术进一步补充而不是替代现有的纯化技术。工业化规模的生物合成人胰岛素纯化包括一系列步骤如图 7.4 所示。

虽然额外纯化步骤的引进降低了整个胰岛素的产量，但它们增加了终产品纯度。现在生产中已经可以做到保证总产量的同时使产品纯度达到或超过 98%。RP-HPLC 是一个特别有效的纯化步骤。这种层析技术能够有效地从大范围的杂质中分离出胰岛素分子，这些杂质中有许多很难用常规的低压层析方法去除。目前在工业化规模生产中用于胰岛素纯化的 RP-HPLC 柱，其装载体积接近 80L，这种柱子运转一次就可以纯化出几百克的胰岛素。

在现代高纯度胰岛素的生产过程中，HPLC 和 FPLC 都广泛用于产品的纯度分析。这些技术在生产过程中的质量控制和终产品纯度的评估中扮演了非常重要的角色，它们快速和灵敏的特点使它们特别适合这样的任务。例如，RP-HPLC 可以区分单个氨基酸残基不同的胰岛素分子，它还可以检测出胰岛素的不同修饰形式，比如脱氨基、甲酰化或胰岛素多聚体。

7.2.6　胰岛素配方

当胰岛素直接注射进血管，它的半衰期仅为几分钟，显然这样短的半衰期使它很难应用于糖尿病患者的临床治疗。皮下注射便于延长激素从注射部位释放到血液的时间，这种给药方式已经成为胰岛素应用的优先办法。胰岛素制品还可以用许多方式配制以增加其作用的持续时间。例如，这种激素可以和鱼精蛋白配合，进一步延迟其向血液中的释放。另外，锌可以加入到最终的制品中以提高胰岛素晶体在组成的锌-胰岛素悬浮液中的生长。可溶的胰岛素经常被称为短效胰岛素，活力持续时间 8h。激素的活力高峰在这种情况下出现在 3～4h。长效胰岛素制品，像那些包含鱼精蛋白和/或锌的，活性通常可保持长达 36h。

7.2.7　工程胰岛素

天然胰岛素分子趋向于自发的相互作用而形成寡聚体（二聚体和特殊的六聚体）。自缔合主要是因为在位于靠近的胰岛素分子 B 链近 C 端的氨基酸残基之间形成链内氢键。当皮下注射时，胰岛素寡聚体在单个分子从注射部位渗透到血管之前必须彼此分离。这种解聚是胰岛素吸收的限速步骤。所以糖尿病患者必须在吃饭前至少 30～40min 自己注射胰岛素制品，有时很不方便，而且如果病人接着由于某种原因没有吃饭会导致低血糖症。

改变胰岛素 B 链靠近 C 端的氨基酸序列可以降低这些分子自缔合的倾向。这样就能够产生更快的反应胰岛素。代表这两种更快反应的胰岛素 lispro 和胰岛素 aspart 现在获准在医学上应用。这些修饰的胰岛素由糖尿病患者自己在饭前立即注射。

天然的人胰岛素分别在 B28 和 B29 处包含一个脯氨酸和一个赖氨酸残基（图 7.3）。胰岛素 lispro 的不同之处是这两个氨基酸位置是颠倒的。胰岛素 aspart 区别于天然胰岛素的是在 B28 处的脯氨酸被一个天冬氨酸所替代。

7.3　胰高血糖素

胰高血糖素是由胰岛细胞中 α 细胞合成的一种多肽激素。它也可以由胃肠道中相关的细胞类型合成。胰高血糖素由 29 个氨基酸组成，分子质量大约 3.5ku。从不同动物物种分离的这种激素的氨基酸序列几乎是相同的。在有胰岛素的情况下，胰高血糖素似乎最初是以胰高血糖素原的形式合成的。胰高血糖素原经过两条单独的蛋白水解途径转变成胰高血糖素。

胰高血糖素是一种高血糖症激素，引起受者血液中葡萄糖浓度的增加。这样就抑制了胰岛素引起的生理反应。血液中葡萄糖浓度的升高是通过刺激增加糖异生的速度和肝糖原的降解速度的结果。它还可以促进脂解速度的增加和脂肪组织和肌肉的葡萄糖利用率的降低。胰高血糖素有时在临床上被用来逆转糖尿病患者由胰岛素引起的低血糖症。

虽然胰高血糖素可以直接从胰腺组织中提取已经有很多年，但市场上近来已出现更多的重组胰高血糖素产品（表 7.1）。这些产品除了能够对抗低血糖症，还可以用于胃部放射性检查的辅助诊断。胃壁平滑肌释放这种激素，在放射性检查过程中通过减少胃容积获得更好的能动性图像。

7.4 促性腺激素

促性腺激素，顾名思义，主要是对雄性和雌性性腺产生作用。许多促性腺激素可以用于临床治疗多种人类的临床病症，而且可以诱导雌性动物超排卵。

最常用的促性腺激素包括促卵泡成熟激素（follicle-stimulating hormone，FSH）和黄体化激素（luteinizing hormone，LH），也被称为黄体生成激素（interstitial cell stimulating hormone，ICSH）。LH 和 FSH 都是由垂体合成的。另外一种促性腺激素，人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotrophin，hCG）是由孕妇的胎盘产生的。然而有一种称为促卵泡激素的促性腺激素例外，它可以从绝经后期的妇女的尿液中分离得到。孕马血清中出现了一种仅存在于孕马血清的促性腺激素。

7.4.1 促卵泡成熟激素（FSH）、黄体化激素（LH）和人绒毛膜促性腺激素（hCG）

FSH、LH 和 hCG 都是糖蛋白，分子质量分别为 34ku、28ku 和 36ku。LH 和 FSH 都含有大约 16%的糖类，而 hCG 含有的糖类超过 30%。三者都是由一个 α 亚基和 β 亚基组成的二聚体。在任何一种动物物种中这三者的 α 亚基是相同的，而 β 亚基则不同。因此 β 亚基赋予了特殊的分子独特的生物学特性。hCG 的 β 亚基的氨基酸序列与 LH 的 β 亚基高度同源，所以 hCG 具有与 LH 相似的生物活性不足为奇。

对雄性来说，FSH 刺激输精管的滋养细胞产生精母细胞。LH 刺激睾丸间质细胞产生睾丸激素，主要的雄性性激素。对于雌性，FSH 和 LH 在生殖周期中扮演了重要角色。

卵巢是女性最主要的生殖器官。它容纳卵子并合成许多类固醇激素。卵巢中有许多卵泡，每一个卵泡都包含一个卵子，卵子被两层细胞包围。内层的细胞叫做粒层细胞，主要受 FSH 作用。粒层细胞产生雌激素，雌激素是最主要的雌性性激素。外层细胞由膜细胞组成。这些细胞主要受 LH 激素的调节，合成不同的类固醇，然后被粒层细胞合成雌激素时所利用。

在一个正常的月经周期开始时，一些卵泡开始成熟，这一过程主要受 FSH 刺激。紧接着出现一个单个的优势卵泡，其余的卵泡则退化了。前半个月经周期通常被称为卵泡时相。生长的卵泡开始分泌越来越高水平的雌激素，雌激素最终引发 LH 在循环周期中间的释放，大约是人类女性月经周期的第 14 天。这样，依次引发了排卵（也就是从成熟卵泡中释放卵子），结果破裂的卵泡则形成一种被称为黄体的结构。月经周期这时已经进入它的第二时相，黄体时相。黄体分泌雌激素和类固醇激素黄体酮，黄体酮负责修复子宫内膜，为受精卵的着床做准备，并且是胚胎发育所需要的。

如果没有受精，人类黄体的最大寿命通常是 14d，在这段时间里黄体稳定地退化使雌激素、黄体酮的水平降低。这种激素支持的撤销导致月经期子宫内膜组织从体内的脱落。

如果卵泡破裂后释放的卵子着床，黄体就不会退化，而且继续产生黄体酮。妊娠的个体中，黄体是靠 hCG 来维持的，hCG 由胎盘分泌。在尿液中也可检测到 hCG。检测这种激素是妊娠检测试剂盒的基础（第 9 章）。

FSH 和 LH 主要调节雌性生殖过程（图 7.5）。而且还调节雄性生殖力的发育和维持。

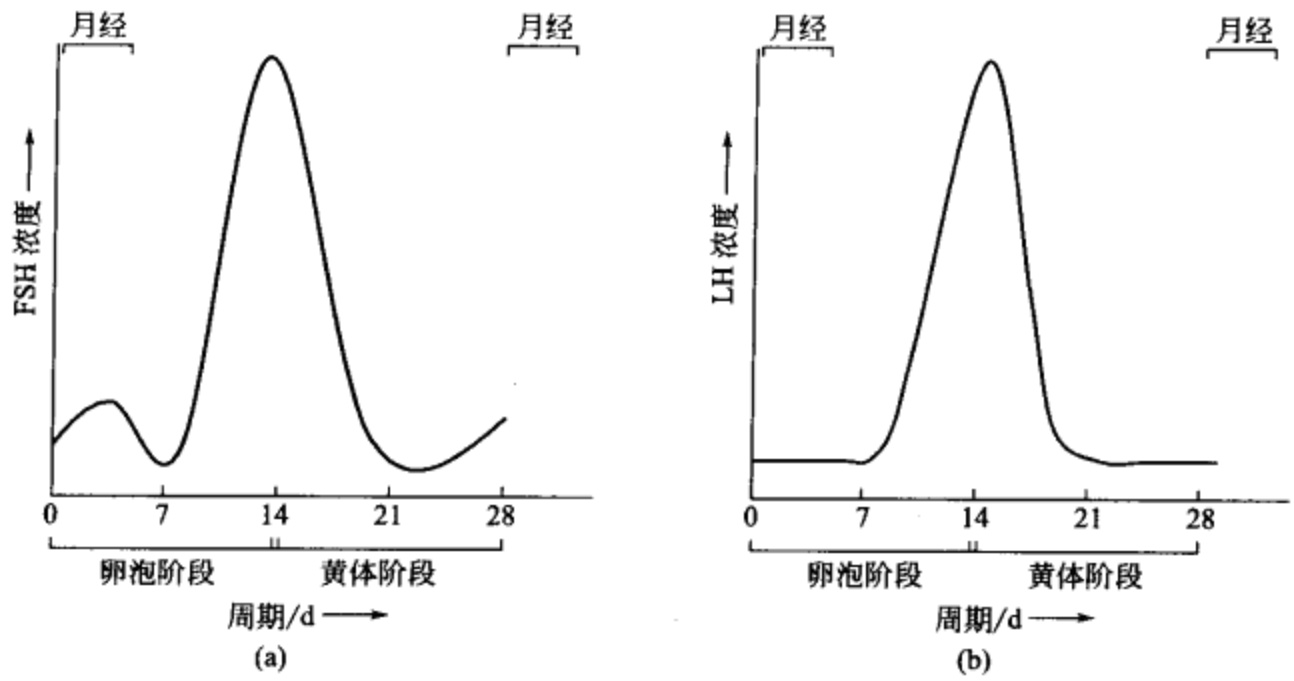


图 7.5　健康妇女在月经周期血浆中 FSH（a）和 LH（b）的变化

这些激素可以用于临床上治疗某些种类的不育，或其他由于激素的低循环水平引起的临床症状。在美国近 10%的育龄夫妇不能生育。每 10 个病案中有 6～7 个的问题出在女性身上。女性不孕的原因有多种，但至少有 20% 的病例归因于下丘脑-垂体-卵巢轴的功能紊乱（图 7.6）。许多这样的病例可以借助外源性 FSH 和 LH 进行治疗。

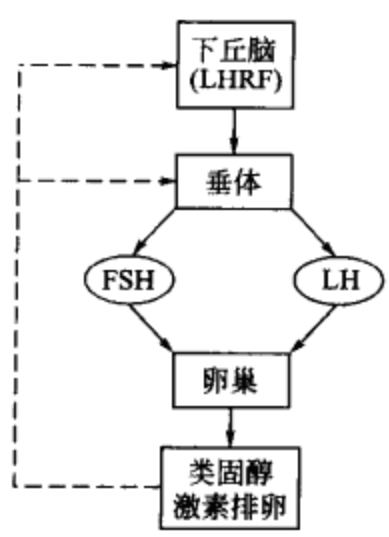


图 7.6　下丘脑-垂体-卵巢轴用以说明不同的生长激素之间的相互作用，其中的虚线部分代表负反馈机制

7.4.2　促卵泡成熟激素（FSH）、黄体化激素（LH）和人绒毛膜促性腺激素（hCG）的来源

FSH 可以从脑垂体中分离到。这样得到的人 FSH 显然是很有限的，而且具有潜在传输病原体的危险而不再被使用。绝经后的妇女尿液中也能发现 FSH。这种来源的制品也具有 LH 活性，称为促卵泡激素。通过分馏程序可以从尿液中提纯促卵泡激素，也可以通过层析技术如离子交换层析法获得。促卵泡激素制品可以经过进一步的层析步骤去除大部分甚至所有污染的 LH 活性。

促卵泡激素在临床上经常用来治疗各种生育并发症如无排卵性不孕，这种不孕是由于循环 FSH 水平低引起或加剧的。

人黄体化激素也可以从垂体中分离得到。同 FSH 一样，其来源也不具有经济上的可行性。hCG，如前所述，显示出许多与 LH 相同或相似的生物学活性。hCG 从孕妇的尿液中提纯相对容易一些。已经发现这种 hCG 制品在治疗由于无 LH 活性引起的临床症状时具有广泛的医学应用价值，而且已经用于临床上治疗不育症以及延缓男性青春期。hCG 和 FSH 一起还用来治疗女性无排卵性不孕。在这种情况下使用的 FSH 刺激卵泡的发育，接着施用的 LH 引起循环中期 LH 的释放，刺激卵泡的最终成熟和破裂。

现在已经生产出重组的 FSH、LH 和 hCG，并且有两种重组人 FSH（rhFSH）制品已经获得规章批准可以医用（见表 7.1）。这些产品都是 FSHα 和 β 基因在 CHO（中国仓鼠卵巢）细胞系中的共表达产物。虽然与尿液来源的产物相比它们的糖基化方式有些不同，但这种产物和天然的人蛋白在氨基酸序列上是一致的。

7.4.3 孕马血清促性腺激素

孕马血清促性腺激素（pregnant mare serum gonadotrophin，PMSG），顾名思义，是从怀孕的马的血清中获得的。PMSG 在马妊娠 40～130d 的血清中维持一个不断升高的水平。PMSG 是一种由 α 亚基和 β 亚基组成的促性腺激素，含有 45%的糖类，其中大部分与 β 亚基有关，在糖类成分中，半乳糖、半乳糖胺和唾液酸中含量尤其高。

PMSG 是一种独特的促性腺激素，因为它同时显示出 FSH 和 LH 相似的生物活性。它的这种生物特异性应归功于其 β 亚基。PMSG 是由妊娠的子宫角的一系列小的杯状突起分泌的。这些富含 PMSG 的结构称为子宫内膜凹陷，而且只存在于马体内。妊娠 37～40d 才开始出现明显的 PMSG，在妊娠大约 70d 达到最高峰，然后开始稳定地消退。子宫内膜凹陷最初是来自胎儿而不是母亲。

通过一系列程序包括 pH 分馏、乙醇沉淀和几个层析步骤（利用凝胶过滤层析法和离子交换介质）可以从血清中得到 PMSG。这种激素虽然对于人没有普遍的临床应用价值，但可以用来诱导某些动物的超排卵。

7.4.4 动物的超排卵

促性腺激素常被用来诱导某些动物的超排卵，最常见的是牛。超排卵的目的是为了诱导多卵泡同时发育以便在交配时有多个卵子。交配以后，可以通过手术或非手术技术取得母体的胚胎。这些收获的胚胎可以移植到几个动物受体体内并一直到后代足月。通过运用这种技术，每一个珍贵动物或一些想要获得其遗传特性的动物的繁衍潜能有效增加了好几倍。一些农场主要采取超排卵和胚胎移植技术来加速提高其牧群的遗传质量。

超排卵基本上涉及到外源性促性腺激素的使用，促性腺激素刺激卵泡的发育。许多农业上很重要的动物物种都一次只有一个卵泡发育成熟。注射外源性 FSH 可以在正常的生理范围内很好地提高其循环水平。这样打乱了调节月经周期的天然激素的平衡，而且引起几个卵泡的发育和成熟。用于超排卵的促性腺激素包括促卵泡激素、猪垂体 FSH（P-FSH）和孕马血清促性腺激素（PMSG）。

P-FSH 是从屠宰的猪的脑垂体中提纯出的 FSH。不像牛垂体那样常规应用，猪垂体的大部分提纯产品用于牛的超排卵。提倡物种间 FSH 而不是与受体同一物种 FSH 的使用是为了降低潜在的由于使用屠宰动物的生物制品而产生的物种特异性疾病的传播风险。

FSH 一般是通过各种分离技术从猪垂体中提取出来的，包括盐和/或乙醇沉淀。层析步骤经常被用到。大多数商业上获取的 FSH 制品都含有几种杂蛋白。在超排卵实验中应用含低量 LH 的 FSH 可以得到一个稳定的超排卵反应。

用 PMSG 进行超排卵的方式一般都涉及到这种激素的单剂量使用。当以一个非常低的速度从血液循环中清除 PMSG 时，一个剂量就足够了。牛 PMSG 的清除可以持续 120h。PMSG 制品半衰期的延长应归功于高含量的 *N*-乙酰神经氨酸。一些人认为作为一个超排卵激素，PMSG 的长半衰期对其效力是不利的，因为它可以在排卵后对卵泡发育产生一个持续的刺激，而且减少了重新获得的能发芽胚胎的数量。在合适的时间段以后抗 PMSG 抗体的升高可以用来消除残存的 PMSG 活性。现在普遍认为使用 FSH 比使用 PMSG 能获得更强的排卵反应。

大多数超排卵方式都是每天使用 FSH 两次，连续使用大约 4d。要保证大量的卵泡发育需要规律性注射这种激素，因为 FSH 在血清中的半衰期相对较短。通常用来延长每次注射效力的尝试是皮下注射这种制品。注射以后紧接着使用一个单一剂量的 LH，对于卵泡的最终成熟以及从卵巢中的释放，这样做是必要的。

当 FSH 制品用于诱导卵泡发育时，产生的超排卵反应可能会大不相同。从超排卵的牛中获得的能发育的胚胎的数量可以是从 0 到 50 不等或更多，尽管 5～8 个胚胎代表了平均的数量。这种与超排卵方式相关的不同受许多因素影响，现在只明确了其中的一些。动物的一般健康状况，使用严格的程序以及涉及到的个人经验和技术能力都影响了这个过程，所使用的制品中 FSH 与 LH 活性的比率似乎也影响到最终的结果，因为 FSH 制品含有低 LH 活性时显得更有效。研究表明一种牌子（垂体来源）FSH 制品的不同批次其 FSH 与 LH 活性的比率可以相差到 20 倍。纯化的重组 FSH 制品在这一点上显得更有效些。

牛 FSHα 亚基和 β 亚基的 cDNA 已经在鼠上皮细胞系中被克隆和表达。产生有生物活性 FSH 的克隆已被选择，而且其发酵规模已扩大到可以满足生产目的。合成的重组 FSH 可以经过 3 个纯化过程得到纯度达 95%以上的产品。这种重组的制品当然不含有杂质 LH 活性。

7.4.5　抑制素

抑制素是一种由性腺产生的糖蛋白。它在睾丸的滋养细胞和卵巢的粒层细胞中合成。这个激素是二聚体，由 α 亚基和 β 亚基组成。已经鉴定出有两种形式的抑制素分子，抑制素 A 和抑制素 B，两种形式的 α 亚基是一样的，而 β 亚基在氨基酸序列上是不同的。

循环中 FSH 浓度的升高刺激抑制素的合成。在 FSH 作用的反馈抑制中抑制素起到重要作用，因为它选择性抑制垂体分泌 FSH。由于其降低循环中 FSH 水平，抑制素被研究可作为一种男女避孕品。

7.5　生长激素

生长激素（growth hormone，GH）是一种种属特异性激素，由垂体前叶分泌，是机体正常生长和泌乳所必需的。在促进机体的蛋白合成、调节糖和脂代谢过程中发挥着重要的作用。对保持体内为生长所必需物质方面发挥着重要的作用。

生长激素的分泌由下丘脑分泌的生长激素释放因子（growth hormone releasing factor，GH-RF，见表 7.3）所调控，生长激素释放的抑制通过另一种由下丘脑分泌的生长激素抑制素所调控。

表 7.3　已经批准临床应用或正在进行药用评估的多肽调控因子

调控因子	医学应用
催产素	生产的诱导
加压素	糖尿病
黄体激素释放因子(LH-RF)	某些类型不孕症患者的治疗
生长激素抑制素	胃肠功能失调
生长激素释放因子(GHRF)	缺乏生长因子的诊断和治疗
促甲状腺激素释放激素	脑-垂体-甲状腺轴紊乱的诊断
血管紧缩素 Ⅱ	升高血压

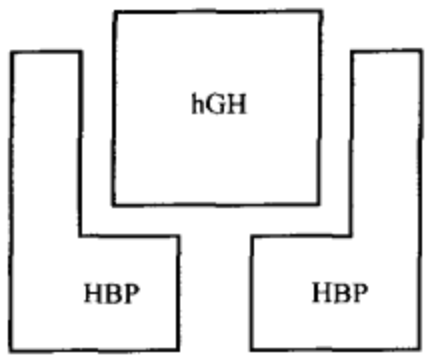


图 7.7

人生长激素（human growth hormone，hGH）与两分子的激素结合蛋白（hormone binding protein，HBP）相结合，这个过程在血清中自然发生，激素结合蛋白与效应细胞的质膜外 hGH 受体的配基结合域相同。第一个分子 HBP 的结合可有效地促进第二个分子与生长激素的结合

生长激素通过结合于细胞表面的特殊受体而发挥作用。该受体由 3 部分组成，胞外配基结合域、跨膜区和细胞内效应区。目前，人们对生长激素与受体结合并发挥作用的精确分子机制了解还很少。在血清中可发现一种与生长激素膜外受体结合域相似的蛋白质，能够与生长激素结合，它可能在激素的体内清除过程中发挥重要的作用（图 7.7）。

生长激素受体可以在多种组织内检测到，它主要在肝脏中发挥作用，刺激生长调节素或类胰岛素生长因子（insulin-like growth factor-1，IGF-1）的合成，IGF-1 直接介导了生长激素的生长促进作用，如后文所述。

人体生长激素的分泌不足导致侏儒症，生长激素分泌过量导致巨人症或肢端肥大症，特征为脸、手和脚的体积增大。生长激素可以用来治疗垂体性侏儒症，由于生长激素的种属特异性，所以在对人的医疗中只能应用人的生长激素。

人生长激素（hGH）是由 191 个氨基酸残基构成，含有两个分子内二硫键，分子质量约为 21ku。直到 20 世纪 80 年代中期，人生长激素的来源还只能来源于人的垂体，因此，生长激素的应用受到了很大的限制。同时，这种生长激素制剂会含有一些生长激素异构体或其他蛋白质等污染物。

在 1985 年，一些病人由于使用被克-雅病致病因子（Greutzfeldt-Jakob disease，CJD）污染的人生长激素制剂而患病，因此，从人垂体中提取生长激素被禁止。

在 *E. coli* 中表达人生长激素的 cDNA，使大规模获得无致病因子污染的人生长激素变为现实。重组蛋白产品中大部分氨基酸序列与天然的生长激素一致，但由于 cDNA 的起始密码子 AUG 的存在，而在序列中比天然氨基酸多一个甲硫氨酸残基。这种甲硫氨酰化的人生长激素与天然生长激素具有相同的生物活性，它在 1985 年得到批准应用于临床，主要用于治疗人身材矮小。

为了保证纯度，重组人生长激素经过了一系列的纯化步骤，包括硫酸铵沉淀、二氨基纤维素离子交换层析、凝胶过滤层析（Sephacryl S-200）等。免疫亲和层析也常用于纯化天然或重组的人生长激素。大量生长激素的制备为深入研究它的潜在价值起到促进作用。目前已有证据显示该激素在烧伤、消化性溃疡、骨质疏松症、髋骨折和多种癌症的治疗中发挥作用。此外，它对合成代谢的影响，使其用于促进肌肉生长，甚至用于延缓衰老。

牛生长激素

除了人生长激素，人们也利用重组系统生成几种其他动物的生长激素。重组牛生长激素（recombinant bovine growth hormone，rbGH）可用于促进奶牛的产奶量。同人生长激素一样，重组 DNA 技术的发展也促进了重组牛生长激素的大规模生产，一些生物制品公司已批量生产了重组牛生长激素。

人们进行一定的实验观察后，在对牛使用牛生长激素时，并不考虑其可能对牛奶或牛肉的消费者健康产生不良影响。这些实验包括：牛生长激素对人体并无生物学活性，而且它同大多数蛋白质食品一样，会在人的胃肠消化作用下而降解。对牛生长激素的

毒性研究表明，尽管小鼠对于注射牛生长激素有反应，但小鼠口服重组牛生长激素无活性。

对奶牛使用牛生长激素会导致牛奶内的 IGF-1 浓度的提高（见后面章节），牛的 IGF-1 与人的 IGF-1 结构是相同的。但毒性研究表明，小鼠口服牛 IGF-1 无不良影响。同时，应用了 rbGH 的牛奶内 IGF-1 的浓度并不比人正常乳汁内的 IGF-1 含量高。

7.6　促红细胞生成素

促红细胞生成素（erythropoietin，EPO）是一种由肾脏产生的糖蛋白激素。这种激素刺激干细胞转变为红细胞。这种激素的分子质量为 36ku，60％成分为糖类。含有 4 个潜在的糖基化位点，其组成部分包含有大量的唾液酸及不定量的己糖和氨基己糖，糖成分的去除可以通过促进它在血浆中的降解而明显降低它在体内的生物学活性。EPO 主要存在于血浆中，在尿中也有少量的存在，并可以从尿中进行纯化。

EPO 在体内可以通过数种方式进行调节，最主要的是组织内氧分压。在高度贫血病人体内，组织供氧不足可导致 EPO 在血浆内浓度提高 100 倍。在一些条件下，如肾衰竭，可导致 EPO 产生水平下降。可导致继发性的贫血。EPO 分泌不足而导致的恶性后果可通过外源性 EPO 制剂而避免。

药用 EPO 通过重组 DNA 技术进行生产。人们第一次用编码人 EPO 的 cDNA 在重组系统内表达 EPO 是在 1984 年。已有多个公司获得生产人 EPO 的许可（表 7.1）。重组产品无论在序列上或是生物学活性上都与天然产品相同。它们在应用中具有明显的疗效（贫血或相关疾病），市场价值约为 20 亿美元。重组产品主要通过真核细胞系进行生产（CHO 细胞系），它可以对产品进行有效的糖基化。

EPO 是一个刺激血细胞生长家族的成员，这个家族成员还包括造血生长因子、集落刺激因子和多种白介素。

7.7　其他生长因子

目前，一些其他的生长因子的治疗作用也引起了人们的的兴趣（表 7.2），如重组人血小板生长因子（recombinant human platelet derived growth factor，rhPDGF）已经被证明具有治疗作用。对这些因子的不同制剂正在进行着大量临床实验，在不远的将来，它们会被证明能够发挥更广泛的作用。这些生长因子能使细胞发生增殖和分化而表现出促有丝分裂作用。大多数临床实验集中于它们对于加速伤口愈合过程和治疗溃疡的有效作用。溃疡一般指持续不能愈合的皮肤或是黏膜的破损。自然的伤口愈合过程起始于伤口处组织中生长因子的释放。

凝血酶即血液凝固途径中的Ⅱa 因子（见第 5 章），刺激 α 颗粒从血小板中的释放。这些颗粒含有多种生长因子，包括成纤维生长因子（fibroblast growth factor，FGF）、PDGF 及转化生长因子（transforming growth factor，TGF）。这些生长因子对一些具有修补组织作用的细胞类型具有促有丝分裂作用，并表现出趋化性的效果，以这种方式吸引一定类型的

细胞至损伤位点。如吸引巨噬细胞至损伤位点释放转化生长因子，还可释放不同的生长因子，如 PDGF 和 TGF。EGF 是一种上皮细胞有丝分裂原，对于伤口的愈合发挥着本质的作用。

7.7.1 血小板源生长因子

血小板源生长因子（platelet-derived growth factor，缩写作 PDGF）最早分离自血小板，后来证实其为其他几种细胞合成和分泌。PDGF 对于多种细胞而言都是一种强有力的有丝分裂原，如成纤维细胞、神经胶质细胞和平滑肌细胞。其分子质量为 30ku，由 A 和 B 两条多肽链组成，并通过链内二硫键共价连接。目前已分离到它的 3 种异构体，包括同型异构体 AA、BB 和异型异构体 AB，A 链由 124 个氨基酸组成，B 链由 140 个氨基酸组成。

两种不同但有关联的 PDGF 受体已经被分离，分别命名为 α 受体和 β 受体，两种受体都具有酪氨酸激酶活性，α 受体与 3 种同工酶都能结合并具有高度的亲和力，而 β 受体与 3 种同工酶以不同的结合力结合，结合力由弱至强顺序为 AA、AB、BB。PDGF 在伤口愈合过程中发挥着重要的作用，其潜在的药用价值正在为不同的生物制药厂进行评估。目前重组 PDGF 产品已进入市场，商品名为 Regranex。该产品经证明能加速糖尿病患者皮肤溃疡的愈合，它是 PDGF B 链的同型二聚体。两条链以反平行方式排列，通过一个分子内二硫键连接。该产品由含有 PDGF B 链基因的 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株生产，终产品为胶冻状，通过涂抹于伤口表面用药。

7.7.2 胰岛素样生长因子

胰岛素样生长因子（insulin-like growth factor，IGF）是由 3 个相关的多肽调控因子组成的家族：胰岛素、IGF-1 和 IGF-2。家族成员 50%的氨基酸具有同源性。家族成员的结构与胰岛素相似，除了 C 端序列和延长的羧基末端区域。IGF 随血液在全身循环，可与 IGF 结合蛋白相结合。结合蛋白可调节 IGF 的生物活性并限制其进入特定的组织。IGF-1 和 IGF-2 的细胞表面受体都已得到鉴定。IGF-1 受体具有酪氨酸激酶活性，在信号转导过程中发挥重要作用。它能被 IGF-1 和 IGF-2 所激活。一种仅与 IGF-2 结合的受体也被发现，但其无任何信号转导能力，生理功能未知。IGF-1 受体广泛分布于全身各处。IGF 主要在肝脏内合成并被直接释放到循环系统中。因此表现为内分泌激素活性，同时在多种其他组织中也有少量合成，表现为旁分泌和自分泌激素的特性。

人们并没有完全了解 IGF 复杂的生物功能，而重组人 IGF-1 和 IGF-2 将有助于人们进一步阐明它们的生理功能。它们在胚胎发育过程中发挥着重要的作用。在出生后 IGF-1 在调节生长的过程中起到重要的作用，IGF-2 的生理功能还不为人所知。IGF-1 能够介导生长因子的生长促进作用，促进骨的形成，抑制肌蛋白的降解，在肌细胞内能够上调葡萄糖和蛋白质的合成，促进神经的存活和髓磷脂的合成。这些生理功能可能使其在治疗身材矮小骨质疏松症、神经功能失调中发挥作用。早期的应用主要集中于治疗 Laron 侏儒症，这种疾病主要由于患者的细胞表面生长激素受体发生突变而失去了正常的生理功能。对患者应用 IGF-1 通常可以诱导其发育。还有其他的病例表明它可以增加蛋白的合成，减少脂肪积累。因此可以

应用于治疗肥胖症。

7.7.3　表皮生长因子

表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）是全部生长因子中最广泛了解的生长因子，人表面生长因子是首先从尿中被分离出来，由于其具有抑制胃酸分泌的作用，所以称之为尿抑胃素，其从鼠的唾液腺中分离，并对其进行了大量的研究。其被证实对很多的细胞类型存在着一种强力的促有丝分裂的作用，如上皮细胞、内皮细胞或成纤维细胞。皮肤是其主要的靶组织，它在表皮的生长和发育中发挥着重要的作用。它同时也是几种培养细胞系的有效促分裂因子，除了在尿液中出现外，在血液、十二指肠和唾液腺中都要可分离到。

从鼠和人体中分离到的 EGF 都由 53 个氨基酸残基组成，并有 70%的同源性，并含有 3 个分子内二硫键。鼠 EGF 的分子质量为 6041u，人 EGF 的分子质量为 6021u，EGF 起始是由一个分子质量为 128ku 的前体蛋白的一部分，在蛋白酶的作用下，成熟的 EGF 从前体中释放。目前，人和鼠的 EGF 都可通过重组工程菌作为外源蛋白来表达。由于 EGF 前体的 mRNA 较大，科学家们发现仅合成含有 53 个氨基酸成熟 EGF 核酸序列是非常容易的，这种合成的 DNA 可以在大肠杆菌或其他系统中表达。

EGF 受体是一种表现为酪氨酸蛋白酶活性的转膜蛋白。已经在许多种细胞表面发现。EGF 与其受体结合后可使敏感的细胞产生促有丝分裂反应，这是由于细胞的蛋白质和核酸的形成增加、代谢物进入细胞加强以及细胞内代谢的活性增加。

表皮生长因子可能对羊脱毛产生一定的作用，应用 EGF 可表现为瞬时地但有效作用于羊毛囊细胞，结果是使羊皮毛变弱，方便了羊毛的采集。因为在农业生产中的广泛应用，所以对 EGF 有广泛的需求。这种需求可以通过重组 DNA 技术得以满足。

7.7.4　成纤维生长因子

成纤维生长因子（fibroblast growth factor，FGF）最早是从脑和垂体中提取，这种生长因子在成纤维细胞培养中具有明显的促有丝分裂作用，成纤维细胞是广泛分布于连接组织中的细胞类型，这些细胞产生连接组织的基本物质以及胶原和弹性纤维的前体，它可以诱导其他几种类型的细胞，如成骨细胞、神经胶质细胞、平滑肌细胞和血管内皮细胞的生长和分化。它能有效地诱导血管生长而具有广泛的药理应用。

目前已存在两种 FGF，被称之为酸性 FGF 和碱性 FGF，酸性 FGF 两种相关的形式已经得到分离。其中一个由 140 个氨基酸组成，另一个是以缺 6 个氨基端氨基酸残基的较短的形式存在，酸性 FGF 等电点为 5～7。碱性 FGF 也是一种单链多肽，由 146 个氨基酸残基组成，其等电点为 9.5。

酸性 FGF 和碱性 FGF 都能结合相同的受体，但碱性 FGF 的结合作用更强。重组 DNA 技术使人和牛 FGF 的大规模生产更为方便，同时促进了人们对于进一步阐明这些生长因子的活性机制的研究，对评估它们的潜在的药用价值提供了动力。两种 FGF 都能与肝素结合，这使利用肝素亲和色谱分离 FGF 变得很方便。反相的高效液相色谱用于进一步纯化酸性的 FGF。

7.7.5 转化生长因子

几种转化生长因子（transforming growth factors，TGF）的潜在药用价值已经被鉴定，TGF-α 与 EGF 表现出相似的生物活性，在不同类型的肿瘤中出现，TGF-α 在正常的细胞类型中也出现，如被激活的巨噬细胞。

TGF-β 是另一种转化生长因子，其由两个独立的多肽链二聚体组成，人们对两种 TGF-β_s 都已比较熟悉，并将它们分别命名为 TGF-β_1 和 TGF-β_2，它们在氨基酸序列上具有较高的相似性。

TGF 具有不同的生理活性，大多的 TGF 与不同种类的细胞生长状态的调整有关，TGF-β_1 具有免疫调节功能，可以抑制 B 细胞和 T 细胞的增殖。TGF-β_s 在关节炎患者的关节液中被发现。近来的实验结果表明，TGF-β_s 可以抑制关节炎的进程。这些生长因子成为了学术和工业研究的目标。

至今，已有多种生长因子被证明与多种癌基因的多肽产物关系密切，在人的数种肿瘤细胞中已经分离到的几种生长因子与 FGF 非常相似，猿肿瘤病毒 $p28^{SIS}$ 与 PDGF 具有较大的同源性，而 EGF 与 TGF-α 具有较高的同源性，然而，EGF 受体在某些类型肿瘤的发生过程中也存在，肿瘤基因 c-erb B 的表达产物与 EGF 受体具有相似的氨基酸序列。

7.8 促甲状腺素

促甲状腺素，又称为甲状腺刺激激素（thyroid-stimulating hormone，TSH），是由垂体前叶释放的激素，TSH 是由 α 和 β 两个亚基组成的二聚体，完整的人 TSH 的分子质量为 28ku，TSH 的 α 亚基与由垂体前叶分泌的另两个糖蛋白 FSH 和 LH 的 α 亚基序列具有一致性。β 亚基使 TSH 生物活性具有一定的特征，α 亚基和 β 亚基内部都有几个二硫键，这使 TSH 成为硫含量最高的蛋白。

TSH 从垂体前叶的释放由两种下丘脑激素控制。促甲状腺激素释放激素（thyrotrophin releasing hormone，TRH）是一种三肽，刺激促甲状腺激素的释放，这是第一种被分离和研究的调整促甲状腺素的调整因子。TRH 可以通过化学合成或下丘脑提取物获得。已经生成的几种 TRH 的类似物具有不同的效能水平。TRH 能刺激催乳激素从垂体的释放，它可以用于诊断下丘脑-垂体的机能紊乱。TSH 从垂体的释放被另一种下丘脑激素（生长激素抑制素）所抑制。

促甲状腺激素在血液循环中的增加刺激了甲状腺中碘的水平的提高，三碘（T_3）和四碘（T_4）甲状腺素合成和释放的水平也增加。反之，T_3 和 T_4 在血液循环中的增加也能减少 TSH 和 TRH 的分泌。特异结合甲状腺激素的受体出现于脑下垂体或下丘脑。T_3 和 T_4 与受体的结合介导了这种抑制效果。

促甲状腺激素用于甲状腺机能减退的诊断，当前的诊断依赖于放射免疫测定血液循环中促甲状腺激素的水平。

7.9　促肾上腺皮质激素

促肾上腺皮质激素也被称作促皮激素（adrenocorticotrophic hormone，ACTH），它和其他几种激素在垂体前叶中合成（图 7.8）。该激素由单条多肽链组成，人类的促肾上腺皮质激素含有 39 个氨基酸，分子质量为 4.5ku。ACTH 已经从不同的动物体内得到纯化，在不同的种属中，ACTH 的前 24 个氨基酸序列是一致的，并且保持了完整的 ACTH 所具有的生物学功能。因此这种合成的多肽可以作为天然 ACTH 的替代品用于治疗。以前，人们也从屠宰的动物的垂体中获得全长的促肾上腺皮质激素用于治疗目的。

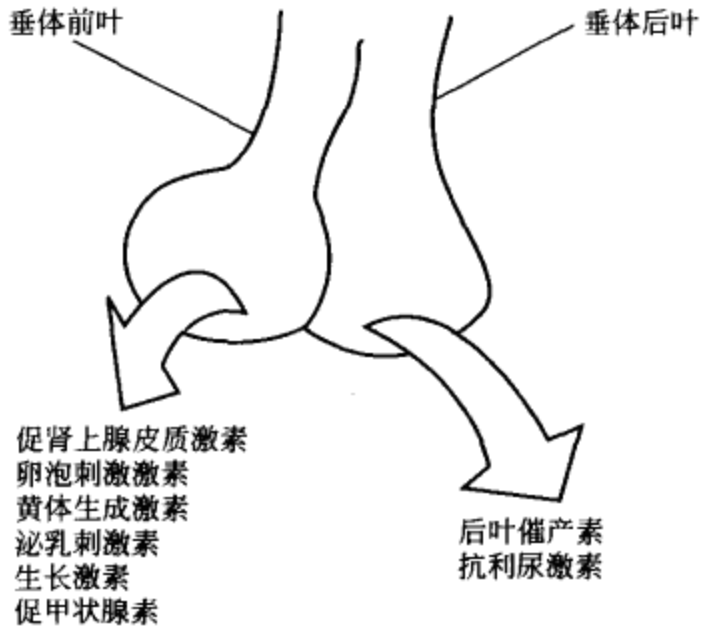


图 7.8　脑下垂体分泌的激素

注射的促肾上腺皮质激素在体内降解很快。在血液内的半衰期仅为 15min。当其以 ACTH-凝胶或 ACTH-锌的形式肌肉内给药会延长作用效果。因为通过这种方式给药会降低促肾上腺皮质激素向循环系统内释放的速率。

ATCH 能够促进肾上腺皮质的生长，促进肾上腺皮质激素的合成和释放。它通过增加胆固醇到孕烯醇酮的转化比率来增加类固醇激素的合成。这种转变是促肾上腺皮质激素合成的限速步骤。

在医疗中应用 ACTH 可以诱导血液循环中类固醇激素水平的增加，尤其皮质醇和盐皮质激素。提高类固醇激素的水平已被证明对于治疗生理功能紊乱有作用。近年来，ACTH 的使用已经减少。更多的医生倾向于对病人直接使用类固醇激素。

促肾上腺皮质激素从垂体的分泌，由下丘脑调整因子即促肾上腺皮质激素释放因子（corticotrophin releasing factor，CRF）的刺激产生。CRF 是一种含有 41 个氨基酸的多肽，它也可刺激 β 内啡肽从垂体的分泌。

7.10　泌乳刺激素

泌乳刺激素是一种由垂体前叶合成的单链多肽激素。其分子质量为 22～23ku，含有 199 个氨基酸。

泌乳刺激素具有多种生理功能。对于人类，它是与雌激素和糖（肾上腺）皮质激素结合。刺激乳腺组织的生长和发育，促进乳汁的分泌，当泌乳刺激素与乳腺组织膜受体结合后，能立即增加细胞内编码乳蛋白，如编码乳白蛋白和酪蛋白的 mRNA 浓度增加。它同时对于性腺的发育也有一定的影响，在卵巢和睾丸上都能检测到泌乳刺激素的受体。

垂体分泌泌乳刺激素受到下丘脑因子的调控，它的分泌抑制受到下丘脑多巴胺分泌的调

控。诱导睡眠、压力、受孕的因子都能够诱导泌乳刺激素的分泌。有关于泌乳刺激素的精确分子结构还有待于进一步阐明。

7.11 多肽调控因子

本章到目前为止主要集中于多肽激素和生长因子。人体也生产一定的多肽调控因子。其中许多都具有药用价值或潜在的药用价值（如表 7.3）。这些多肽调控因子可直接从天然来源中提取。由于其天然含量极低，无法应用于大规模生产中。所以，大多数的产品是通过化学合成的方法获得（见第 2 章）。化学合成的方法也很有利于生产具有可变序列但同样具有药用价值的调控肽。

7.11.1 催产素和加压素

垂体后叶充当了两种肽类激素（即催产素和加压素）的贮藏和分泌器官。这两种激素都是由 9 个氨基酸残基组成的肽（图 7.9）。它们由特殊的下丘脑细胞合成，紧接着沿轴突途径以囊泡形式直接传输到垂体后叶。这两种激素与后叶激素运载蛋白相关。

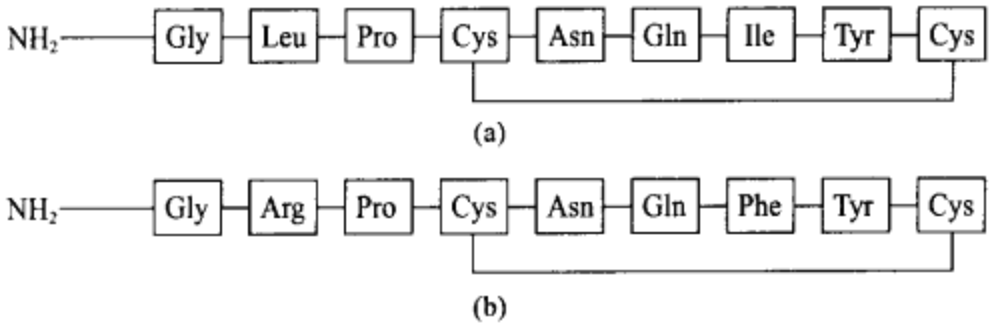


图 7.9 催产素（a）和加压素（b）的氨基酸序列非常相似

加压素也被称为抗利尿激素（antidiuretic hormone，ADH）。它是体内主要的抗利尿激素，对肾产生一个直接作用加速水在末端肾小管的重吸收。虽然可以通过提纯垂体腺获得加压素，但通常是用化学合成的方法来获得。天然的加压素有两种形式。氨基酸序列仅在第 8 位有区别。精氨酸加压素（argipressin）在肽链第 8 个残基的位置含有一个精氨酸残基，分子质量 1084u。这种氨基酸序列的加压素存在于人、绵羊、牛、马和鸡的垂体，作为医用的也是这种形式的加压素。赖氨酸加压素，分子质量 1056u，在其分子的第 8 个残基的位置含有一个赖氨酸残基，在猪的垂体中发现了这种形式的加压素。

循环水平抗利尿激素的不足会导致尿崩症的发作，这是一种相对少见的新陈代谢紊乱，使正常的肾的水重吸收能力降低。受此影响的个体会持续感到口渴但排出大量稀释的尿液。不管是通过肠胃外注射还是鼻腔喷雾，用抗利尿激素可以有效治疗这种症状。

Demopressin（1-脱氨基-8D-精氨酸加压素）是一种加压素类似物，临床上经常作为加压素的替代品，因为它显示出更强的抗利尿活力和更长的作用持续时间。

催产素和加压素一样是一个九肽。它含有一个链内二硫键，分子质量 1007u。它可以由

化学合成，或者从屠宰的家畜垂体腺中提纯。

催产素能引起子宫平滑肌的收缩。因此临床上可以用于诱导和维持分娩时子宫的收缩。它能在不同的黏膜处被吸收，可以经胃肠外注射或者鼻腔喷雾。

Demoxytocin 是一种合成的催产素类似物，在诱导分娩时可作为天然激素的替代品，因为它具有更强的作用，而且循环半衰期更长。催产素还可以刺激哺乳期乳房平滑肌的收缩，促进乳汁的排出。因此哺乳时可用来促进乳汁的释放。

7.11.2　黄体化激素释放因子

黄体化激素释放因子（luteinising hormone-releasing factor，LH-RF）是一种由下丘脑合成的十肽，也被称为促性腺激素释放激素或促黄体生成素释放素（图 7.10）。由下丘脑分泌的 LH-RF 直接被转运到垂体，在这里刺激黄体化激素（LH）和促卵泡成熟激素（FSH）的合成和释放。

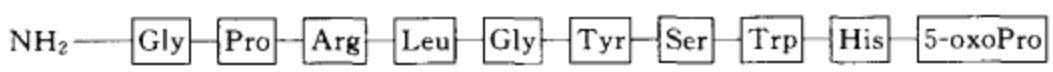


图 7.10　黄体化激素释放因子的氨基酸序列

下丘脑合成的调节因子量极少，因此用下丘脑来源的制品来满足临床上的用量是不太实际的。化学合成的 LH-RF 已经用于治疗（皮下、静脉内、鼻内）人和动物的低生育力或不孕。它通过促进促性腺激素的分泌来增强正常的下丘脑-垂体功能而提高受孕比率。它还可以用来诊断下丘脑-垂体-性腺功能紊乱。这种释放因子在临床上还用来治疗某种恶性肿瘤和隐睾病（以在正常的发育过程中睾丸不能下降到阴囊为临床症状）。

在许多情况下 LH-RF 的类似物被用于临床。与天然的释放因子相比，它们一般都具有更强的功效或更长的作用持续时间。虽然 LH-RF 可以刺激 FSH 和 LH 的合成和释放，但这两种垂体促性腺激素在血液中的浓度变化彼此并不总是直接平行的。选择性影响其中一个或两个的浓度的替代品一定存在。目前较引人注意的这样一种替代品是抑制素。

7.11.3　生长激素抑制素

生长激素抑制素是一种分子质量为 1600u 的十四肽。它主要由下丘脑产生，但也可以由胰岛的 δ 细胞和胃肠道相关细胞合成。生长激素抑制素抑制多种垂体激素的释放，最显著的是生长激素。它还可以抑制胰腺释放胰岛素和胰高血糖素，而且调节胃和十二指肠的分泌。已经发现生长激素抑制素有助于胃十二指肠出血病人的治疗。它还被用来治疗某种激素分泌性肿瘤。生长激素抑制素可以从下丘脑中提纯，但一般用化学合成的方法获得。天然的分子半衰期很短，现在已经获得几种可延长作用持续时间的类似物，包括奥曲肽，是一种已被用于治疗一些类型肿瘤的八肽。

生长激素释放因子，在“7.5 生长激素”一节中已提及，临床上可以用于协助诊断生长激素缺乏，在一些情况下还可以用于治疗以便促进生长激素的分泌。

7.12 进一步的阅读材料

图书

Anonymous (1997) *Pharmaceutical Biotechnology*. Technomic Publishing.

Bauer, C. *et al*. (1993) *Erythropoietin*. Marcel Dekker, New York.

Bengtsson, B. (1999) *Growth Hormone*. Kluwer, Boston.

Brooks, G. (1998) *Biotechnology in Healthcare*. Pharmaceutical Press, London.

Dawson, J. (1994) *Pharmaceutical Biotechnology*. MDIS Publications.

De Fronzo, R. (1997) *Current Therapy of Diabetes Mellitus*. Mosby, London.

Fauser, B. (1997) *FSH Action and Intraovarian Regulation*. Parthenon Publications, Carnforth.

Juul, A. (2000) *Growth Hormone in Adults*. Cambridge University Press, Cambridge.

Koch, K. *et al*. (1988) *Treatment of Renal Anaemia with Recombinant Human Erythropoietin*. Karger, Basel.

Oppenheim, J. (1994) *Clinical Applications of Cytokines*. Oxford University Press, Oxford.

Oxender, D. (1999) *Novel Therapeutics from Modern Biotechnology*. Springer-Verlag, Godalming.

Pickup, J. (1991) *Biotechnology of Insulin Therapy*. Blackwell Science, Oxford.

Stahnke, N. (1992) *Mammalian Cell Derived Recombinant Human Growth Hormone*. Karger, Basel.

Walsh, G. (1998) *Biopharmaceuticals; Biochemistry and Biotechnology*. John Wiley & Sons, Chichester.

Walsh, G. & Murphy, B. (1999) *Biopharmaceuticals, an Industrial Perspective*. Kluwer, Boston.

论文

胰岛素

Combettes, S.-M. & Issad, T. (1998) Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metab.* (Paris) **24**, 477-489.

Johnson, I. S. (1983) Human insulin from recombinant DNA technology. *Science* **219**, 632-637.

Kroeff, E. *et al*. (1989) Production scale purification of biosynthetic human insulin by reverse-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **461**, 45-61.

Nicol, S. & Smith L. (1960) Amino acid sequence of human insulin. *Nature* **187**, 483-485.

Pfeiffer, A. (2000) Current perspectives of biotechnological replacement of insulin secreting cells. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **108** (8), 494-497.

Pharmacia (1983) The large scale purification of insulin by gel filtration chromatography. Pharmacia Fine Chemicals.

Orci, L, *et al*. (1988) The insulin factory. *Sci. Am.* **259**, 50-61.

Ruttenberg, J. (1972) Human insulin: facile synthesis by modification of porcine insulin. *Science* **177**, 623-626.

Schulingkamp, R. *et al*. (2000) Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **24** (8), 855-872.

Vajo, Z. & Duckworth, W. (2000) Genetically engineered insulin analogues: diabetes in the new millenium. *Pharm. Rev.* **52** (1), 1-9.

Whitehead, J *et al*. (2000) Signalling through the insulin receptor. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12** (2), 222-228.

促性腺激素

Boland, M. P. *et. al.* (1991) Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* **35**, 5-17.

Chappel, S. *et al.* (1988) Bovine FSH produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology* **29**, 2135.

Closset, J. & Hennen, G. (1978) Porcine follitropin, isolation and characterization of the native hormone and its a and b subunits. *Eur. J. Biochemi.* **86**, 105-113.

DeJong , F. (1988) Inhibin. *Physiol. Rev.* **68**, 555-595.

Hayden, C. *et al.* (1999) Recombinant gonadotrophins. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **106** (3), 188-196.

Kafi, M. & McGowan, M. (1997) Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **48**, 137-157.

Lindsell, C. *et al.* (1986) Variability in FSH: LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. *Theriogenology* **25**, 167.

Looney, C. *et al.* (1988) Superovulation of donor cows with bovine folliclestimulating hormone (bFSH) produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology* **29**, 271.

Moore, W. & Ward, D. (1980) Pregnant mare serum gonadotrophin. *J. Biol. Chem.* **255**, 6923-6929.

Prevost, R. & Pharm, D. (1998) Recombinant folicle stimulating hormone: new biotechnology for infertility. *Pharmacotherapy* **18**, (5), 1001-1010.

生长激素与生长因子

Furman, T. *et al.* (1987) Recombinant human insulin-like growth factor Ⅱ expressed in *E. coli*. *Bio/Technology* **5**, 1047-1056.

Hull, K. & Harvey, S. (2000) Growth hormone-roles in male reproduction. *Endocrine* **13** (3), 243-250.

Hull, K. & Harvey, S. (2001) Growth hormone: roles in female reproduction. *J. Endocrinol.* **168** (1), 1-23.

Juskevich, J. & Guyer, C. (1990) Bovine growth hormone: human food safety evaluation. *Science* **149**, 875-884.

Kallen, K. *et al.* (2000) New perspectives on the design of cytokines and growth factors. *Trends Biotechnol.* **18** (11), 455-461.

Kopchick, J. & Andry, J. (2000) Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol. Genet. Metab.* **71** (1-2), 293-314.

Koveker, G. (2000) Growth factors in clinical practice. *Int. J. of clin. Pract.* **54** (9), 590-593.

Kurokawa, T. *et al.* (1987) Cloning and expression of cDNA encoding human basic fibroblast growth factor. *FEBS Lett.* **213**, 189-194.

LeRoith, D. (1997) Insulin like growth factors. *N Engl. J. Med.* **336** (9), 633-639.

Olson , K. *et al.* (1981) Purified human growth hormone from *E. coli* is biologically active. *Nature* **293**, 408-411.

Robinson, C. (1990) Polypeptide growth factors-a growth area for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **8**, 59-60.

teaDijike, P. & Iwata, K. (1989) Growth factors for wound healing. *Bio/Techmology* **7**, 793-798.

Thomas. K. & Gimenez-Gallego, G. (1986) Fibroblast growth factors: broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 81-84.

Vos, P. *et al.* (1998) Insulin like growth factor-1: clinical studies. *Drugs Today* **34** (1), 79-90.

Walsh, G. (1995) Nervious excitement over neurotrophic factors . *Biotechnology* **13**, 1167-1171.

促红细胞生成素

Lee-Huang, S. (1984) Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in *E. coli*. *Proc. Nat*

Acad. Sci. USA **81**, 2708-2712.

Sasaki, R. *et al.* (2000) Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **64** (9), 1775-1793.

Tilbrook, P. & Klinken, S. (1999) Erythropoietin and the erythropoietin receptor. *Growth Factors* **17** (1), 25-35.

(许凌峰　译　　史兆兴　校)

第8章

干扰素、白介素和其他调节因子

8.1 调节因子——细胞因子和激素

多年来，对科学家而言激素代表着最主要的一类生物调节因子。作为一类调节因子，激素都具备一定的特征：它们是由无管（内分泌）腺合成的微量生物分子；它们通过血液循环系统被转送到远离生成位点的靶组织；它们通过结合靶组织的特异性细胞表面受体（比如类固醇类激素的受体位于细胞浆）诱导产生特定的调节效应。激素按结构可以分为三类：多肽、氨基化合物和类固醇。

20世纪下半叶，研究者又发现了许多新的调节因子，但是它们的特征并不符合激素的经典定义。其中的许多成员被命名为“细胞因子”——一个最早起源于20世纪70年代的称谓。起初，“细胞因子”专指能够促进免疫系统细胞的增殖、活化和调控的一类调节因子。它代表了主要由白细胞合成并作用于其他白细胞的一类调节因子。与经典的激素不同的是，细胞因子无一例外都是多肽类分子，并且都由非分泌腺体细胞所产生。另外，细胞因子最初被发现是以旁分泌-自分泌（与内分泌相反）的形式发挥作用（旁分泌因子的靶细胞与该细胞因子的合成细胞紧密相邻，自分泌因子的合成细胞与靶细胞是同一个或同一类细胞）。

随后的研究和发现进一步地模糊了细胞因子的概念和细胞因子与多肽激素之间的区别。细胞因子具有非常复杂的生物学性状：可以由不止一种细胞合成，并可以作用于多种靶细胞，可以促使靶细胞产生广泛和复杂的效应。再者，现在已经研究清楚：许多细胞因子既能以内分泌也能以旁分泌-自分泌形式发挥功能，而一些激素只具有旁分泌活性。

主要的多肽类细胞因子包括白介素（IL-1～IL-19），干扰素（IFN-α、IFN-β、IFN-γ、IFN-ω、IFN-τ），集落刺激因子（G-CSF，M-CSF，GM-CSF），肿瘤坏死因子（TNF-α、TNF-β），神经营养因子（NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5），睫状神经营养因子（CNTF），睫状细胞衍生神经营养因子（GDNF），表皮生长因子（EGF），促红细胞生成素（EPO），成纤维细胞生长因子（FGF），白血病抑制因子（LIF），巨噬细胞炎症蛋白（MIP-1α、MIP-1β、MIP-2），血小板衍生生长因子（PDGF），转化生长因子（TGF-α、TGF-β），血小板生成素（TPO）。

G-CSF，粒细胞集落刺激因子；M-CSF，巨噬细胞集落刺激因子；GM-CSF，粒细胞-

巨噬细胞集落刺激因子；NGF，神经生长因子；BDNF，脑衍生神经营养因子；NT，神经营养因子。经许可，文献来自：Biopharmaceuticals，Biochemistry and Biotechnology（John Wiley & Sons，Chister，1998）。

其中部分（例如：红细胞生成素、多肽生长因子）已经在第 7 章中讨论过，本章主要集中讨论迄今已发现的具有实际治疗价值的一些细胞因子，分别是干扰素、白介素、肿瘤坏死因子和集落刺激因子。

8.2 干 扰 素

干扰素（interferon，IFN）于 1957 年首次被发现，也是最早被发现和研究的细胞因子。现已证明所有脊椎动物都产生多种干扰素。这些蛋白质通常具有种属特异性并且大多数哺乳动物至少产生 3 种干扰素：α 干扰素（IFN-α）、β 干扰素（IFN-β）和 γ 干扰素（IFN-γ）。人类能产生 16 种 α 干扰素，但仅产生 1 种 β 干扰素和 1 种 γ 干扰素。

IFN-α 和 IFN-β 都耐酸并且能结合相同的细胞表面受体。因此，这些干扰素都被命名为Ⅰ型干扰素。IFN-γ 不耐酸并且只能结合特定的受体分子，这类干扰素被命名为Ⅱ型干扰素。近年来，又发现了两类新干扰素：ω 干扰素（IFN-ω）和 τ 干扰素（IFN-τ），都属于Ⅰ型干扰素。表 8.1 和表 8.2 列出了干扰素的生物学概要。

表 8.1 传统的人类干扰素以及它们被首次分离的细胞来源

干扰素类型	传 统 名 称	首次分离的细胞来源
IFN-αs(至少存在 16 种亚型)	白细胞干扰素、成淋巴细胞干扰素	白细胞或成淋巴细胞
IFN-β	成纤维细胞干扰素	成纤维细胞
IFN-γ	免疫干扰素	活化的 T 淋巴细胞

表 8.2 干扰素的生物学特征

干扰素	氨基酸残基数量	分子质量/ku	糖基化	主要来源	主要生物学活性
α(多种)	通常 166	16～27	部分	淋巴细胞 单核细胞 巨噬细胞	提供靶细胞抗病毒活性； 抑制多种细胞的增殖； 调节Ⅰ类 MHC 抗原的表达
β	166	20	否	成纤维细胞 上皮细胞	与 IFN-α 类似
γ	143	40～70	是	T 淋巴细胞 自然杀伤细胞	调节免疫与炎性反应的各阶段；抗病毒活性和抗增殖活性较弱
ω	172	20	是	白细胞为主	与其他Ⅰ型干扰素相似
τ	172	19	否	滋养层细胞	怀孕早期维持黄体； 具有其他Ⅰ型干扰素的主要生物学特性

注：IFN-τ 的数据源自反刍动物 IFN，其他 IFN 的数据源自人类 IFN。

MHC：主要组织相容性复合物。

8.2.1 α 干扰素

α 干扰素（IFN-α）最初从白细胞、成淋巴细胞中分离获得，因此又称为白细胞干扰素、

成淋巴细胞干扰素。目前已知至少存在 16 种人类 IFN-αs。尽管它们具有高度的序列同源性，但它们的一级结构却不同，并且这些分子都由一类相关基因家族所编码。大多数人类 IFN-αs 分子是由 165～166 个氨基酸残基构成的单链多肽，富含亮氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺；等电点在 5.5～6.5 之间。大部分 IFN-αs 没有糖链，但少部分 IFN-αs 却是糖蛋白，并且糖基化程度不等，因此，这些 IFN-α 的分子质量处在 16ku 到 26ku 之间，甚至超过 26ku。另外，通过酶学或者化学的方法将糖链去除之后，对 IFN-αs 的生物活性几乎没有影响。

所有 IFN-αs 亚类的表达水平都很低，并且它们具有类似的物理化学特性，因此早先纯化天然的单一 IFN-αs 的努力大多都告失败。20 世纪 70 年代末期和 80 年代早期，研究人员通过采用了包括免疫亲和层析在内的多种高分辨力的层析技术对少数 IFN-αs 进行了纯化并获得了比较高的纯度。除此之外，研究人员还采用了等电聚焦和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electropharesis，SDS-PAGE）等方法进行纯化。IFN-αs 必须和细胞表面特异的受体结合才能发挥其抗病毒、抗增殖、抗炎症反应和调节免疫的功能。目前已经分离并克隆了两种 IFN-αs 受体。其中 IFN-αB 受体似乎只结合一种 IFN-α（称作 IFN-αB 或 IFN-α8），而 IFN-α/β 受体则能够调节所有Ⅰ型干扰素的生物活性。这些受体几乎分布在各种细胞的表面，数量较少，但和配体的亲和力很高。

Ⅰ型干扰素和 IFN-α/β 受体结合后能够激活两种胞浆蛋白酪氨酸激酶：TYK-2 和 JAK-1。这两种激酶再依次磷酸化（并激活）3 种胞浆蛋白——STAT（signal transducers and activators of transcription），活化的 STAT 分子与另一种胞浆蛋白（p48）相作用形成复合体，该复合体移行进入细胞核后再与 IFN 敏感基因的上游调控元件——干扰素刺激反应元件（interferon-stimulated response elements，ISRE）作用，因此 JAK-STAT 途径主要是通过诱导产生特定的细胞产物达到调控Ⅰ型干扰素的生物学功能（图 8.1）。Ⅰ型干扰素还能

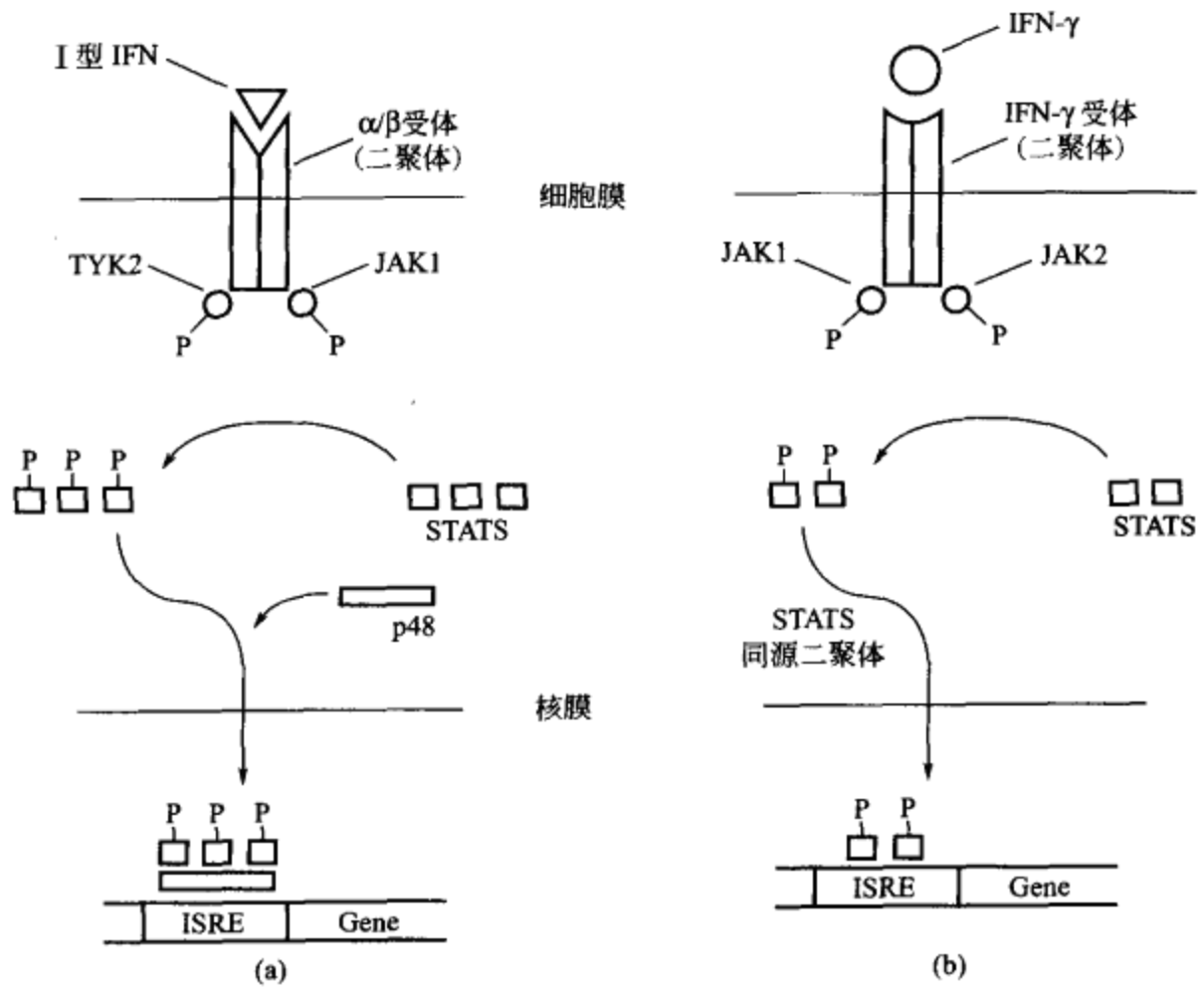


图 8.1　Ⅰ型 IFN（a）和Ⅱ型 IFN（b）诱发信号传导的机制

IFN 与相关受体结合后导致受体形成二聚体，随后激活 JAK-STAT 信号传导途径。详细过程请参考正文

启动不依赖 JAK-STAT 的其他信号传导途径来诱导其他的生物反应。例如，IFN-αs 还可以活化磷脂酶 C、释放二酯酰甘油和花生四烯酸。

8.2.2 β 干扰素

人 β 干扰素（IFN-β）也称为成纤维细胞干扰素，因为它最初是从接触了病毒颗粒或者多聚核苷酸的成纤维细胞中分离到的。目前主要应用重组 DNA 技术生成。人 IFN-β 是第一个被纯化的干扰素分子。该分子是一个由 166 个氨基酸构成的糖蛋白，分子质量约 20ku，等电点（p*I*）约为 8，并含有一个分子内二硫键。IFN-β 的编码基因在人类基因组中只有一个拷贝，其编码产物与 IFN-αs 的氨基酸序列具有 30%的同源性。研究人员采用多种层析技术相结合的方法纯化到了天然的 IFN-β，并采用染料亲和层析（blue sepharose）开发了一步纯化的方法。IFN-β 与Ⅰ型干扰素受体结合之后可以诱导产生与其他Ⅰ型干扰素成员类似的生物学效应（见图 8.1）。

8.2.3 γ 干扰素

γ 干扰素（IFN-γ），常称为免疫干扰素，主要由 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞（natural killer，NK）产生。人 IFN-γ 分子是一种由 143 个氨基酸构成的单链糖蛋白。由于糖基化（该分子含有两个糖基化位点）程度的不同，其分子质量浮动在 15～25ku 范围之间。如前所述，IFN-γ 在物理化学特性以及生物学特性上与Ⅰ型干扰素具有显著差异。它几乎参与调控免疫反应和炎症反应的各个方面，包括 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞和 NK 细胞的分化和活化等。除此之外，它还能影响内皮细胞和成纤维细胞等非白细胞的生长和活化。与Ⅰ型干扰素不同的是，IFN-γ 抗病毒和抗增殖的活性最弱，但当此抗病毒和抗增殖的活性由Ⅰ型干扰素诱导产生，IFN-γ 的抗病毒和抗增殖活性也相应增强。

有生物活性的 IFN-γ 分子是一个同源二聚体，由两个 IFN-γ 单体通过非共价键以反向平行的方式连接构成。每个单体都有 6 个主要 α 螺旋区域，而不含有 β 折叠结构。IFN-γ 的受体却广泛地分布于多数白细胞以及内皮细胞和上皮细胞的表面，因此 IFN-γ 具有上述广泛的生物学活性也就不足为奇。红细胞没有 IFN-γ 的受体。作为配体，IFN-γ 二聚体结合其受体后导致受体分子二聚化从而激活 JAK-STAT 信号传导途径（见图 8.1）。

8.2.4 α 干扰素的生产和医疗应用

直到 20 世纪 70 年代，临床使用的干扰素主要源自捐献血液中的白细胞。然而这种白细胞干扰素含有多种相关的 α 干扰素（IFN-α）分子。但是在这种 IFN 提取物中仅含有约 1%的纯 IFN-α，因此需要提供大量的捐献血液才能满足生产的需求。因此，尽管当时人们都非常看好 IFN-α 潜在的临床应用价值，但是这种细胞因子的匮乏导致其被广泛使用的前景变得非常渺茫。

20 世纪 70 年代后期，研究人员通过培养哺乳动物细胞（非重组技术）首次生产获得大量 IFN-α。应用最多的就是一种称之为 Namalwa 细胞的人成淋巴细胞系。仙台病毒可以诱导 Namalwa 细胞产生可观的白细胞（α）干扰素。Namalwa 白细胞干扰素的工业化生产采

用大容量培养罐，容量可达 8000L，经过下游技术的后续处理可以生产出包括至少 8 种 IFN-α 分子的较纯产品。

目前主要通过重组 DNA 技术进行单一 IFN-αs 的大规模生产。这些方法多数从 20 世纪 80 年代发展起来。多种重组人 IFN-αs 已经采用大肠杆菌、酵母工程菌和猴细胞、CHO 细胞等真核细胞生产。

已获批准应用于临床的部分重组人 IFN-αs（rhIFN-αs）包括 Roferon A、Alferon A 和 Infergen 等（表 8.3），适用于部分病毒病（譬如乙型肝炎、丙型肝炎和尖锐湿疣）以及一些癌症（譬如多毛细胞白血病、肾细胞癌、卡波西肉瘤和非霍奇金淋巴瘤）的治疗。Infergen（已被美国和欧盟于 20 世纪 90 年代末期批准应用于丙型肝炎的治疗）不是天然存在的分子，而是通过重组 DNA 技术用大肠杆菌生产的合成 IFN-α，分子中每一个氨基酸都是几种天然亚型 IFN-α 分子的对应位置的最常见氨基酸。与其他几种已获批准的几种 IFN-αs 制剂相比，这种重组 IFN-α 产品具有更高的抗病毒、抗增殖和活化 NK 细胞的活性。

表 8.3　目前已获批准应用于临床的干扰素制剂

商　品　名	种　　类	原始适应证
Intron A	rhIFNα-2b	多毛细胞白血病，尖锐湿疣
Roferon A	rhIFNα-2a	多毛细胞白血病
Alferon N	rhIFNα-n3	尖锐湿疣
Infergen	rIFN-α	丙型肝炎
Betaferon	rhIFNβ-1b	多发性硬化
Betasteron	rhIFNβ-1b	多发性硬化
Avonex	rhIFNβ-1a	多发性硬化
Rebif	rhIFNβ-1a	多发性硬化
Actimmune	rhIFNγ-1b	慢性肉芽肿

注：每一种商品仅列出了经批准的原始适应证，其他适应证也随后被核准。

多种层析技术已经应用到不同 IFN-α 制剂的生产工艺之中。亲和层析采用了包括抗干扰素单克隆抗体在内的多种固相配体进行纯化，譬如：植物血凝素、反应染料、伴刀豆蛋白 A 和苯基团。其他技术如离子交换，凝胶层析、金属螯合层析和高效液相色谱等也已经成为生产高纯度干扰素的得力手段。另外，一些敏感与便捷的免疫分析技术的应用也使得 IFN 制剂的快速纯化变得更加容易，而早先的分析方法是检测干扰素在细胞培养物中的抗病毒活性，费时费力。

8.2.5　β 干扰素的生产和医疗应用

rhIFN β-1a 是一种由 CHO 细胞系生产的重组人 β 干扰素（IFN-β）。已有两种产品（Avonex 和 Rebif）获准上市（表 8.3）。这些重组产品的氨基酸序列与天然的 IFN-β 相同，并且糖基化。rhIFN β-1b（Betaferon 和 Betasteron，表 8.3）则由大肠杆菌工程菌生产获得。虽然缺乏糖基化但并不影响其医用效果。除了缺乏糖基化以外，IFN β-1b 与天然的 IFN-β 区别是在第 17 位的半胱氨酸替换为丝氨酸。这种基因工程产品在保留了天然 IFN-β 的活性同时还增加了稳定性。

已经证明 rhIFN β-1a、rhIFN β-1b 对多发性硬化（multiple sclerosis，MS）有疗效。MS 是一种神经元外围髓壳受损的神经性疾病，推测遗传因素和病毒感染可能与其有关，但

是发病的最终原因仍未确定。目前该病缺乏有效的治疗，而欧洲每年新增确诊病例超过10000人，并且多数患者罹患此病时都未满30周岁。

现在多数观点认为MS是一种由于免疫系统细胞移行到脑部受损位置的免疫介导疾病，随后产生的炎症可能导致了神经元的损伤。IFN-β很可能通过对此炎症产生反应从而发挥其治疗作用，因为已知IFN-β可以抑制诸如IFN-γ和肿瘤坏死因子等前炎性分子的释放。

8.2.6 γ干扰素的生产和医疗应用

γ干扰素（IFN-γ）之所以极具临床价值在于它的核心作用就是能够促进机体的免疫反应和炎症反应。Actimmune是由大肠杆菌工程菌生产获得的重组rhIFN-γ的商品名。已获批准用于慢性肉芽肿病（chronic granulomatous disease，CGD）的治疗。CGD是一种遗传病，周期性发作并常导致致命感染。这种免疫缺陷会抑制巨噬细胞内还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，NADPH）氧化系统的激活，进而抑制了巨噬细胞产生用以清除微生物的各种氧化反应底物。

临床试验表明，使用IFN-γ能降低CGD患者感染致命性疾病的概率高达50%以上。这种细胞因子似乎能够最大量增加效应细胞（巨噬细胞）的氧化反应底物含量。IFN-γ的另一种治疗效果就是它能够刺激机体产生广泛的免疫反应。

8.2.7 ω干扰素

ω干扰素（IFN-ω）是最新发现的一种Ⅰ型干扰素。这种细胞因子的氨基酸序列与IFN-αs具有60%的同源性，这种172个氨基酸的细胞因子似乎在所有的哺乳动物细胞中都有表达。和IFN-β一样，人IFN-ω也是由单基因编码的，并含有一个单一*N*-糖基化位点（天门酰胺78）。而部分哺乳动物的IFN-ω则由多个不同的（尽管紧密相关）基因编码。

现在，重组人IFN-ω（rhIFN-ω）已经采用CHO和其他细胞系进行规模化生产。和IFN-αs一样，IFN-ω分子内也含有两个二硫键，分别由1～99和29～139的4个半胱氨酸构成。IFN-ω能够结合Ⅰ型IFN-α/β受体，并且可以诱导产生与其他Ⅰ型干扰素同样的生物学反应。尽管IFN-ω具有一定的临床应用前景，但和IFN-αs相比，IFN-ω在有效性和安全性上并没有明显的优越性，因此近期还难以实现商品化。

8.2.8 τ干扰素

τ干扰素（IFN-τ）是一种新型Ⅰ型干扰素，并且是Ⅰ型干扰素中与IFN-ω联系最紧密的一种。它仅出现在绵羊和牛等反刍动物中，至少包含3～4个编码基因。与其他家族中成员不同的是，IFN-τ（过去称作滋养素）又是一种激素前体，由孕体（胚胎及其相关膜）在怀孕早期产生，具有抑制黄体溶解功能（例如防止黄体衰退，而黄体的存在是维持怀孕的必要条件，见第7章）。由于IFN-τ抑制黄体溶解的失败是导致母牛流产的主要原因，因此IFN-τ也将继续成为动物科学领域研究的焦点。

除了具有生殖活性以外，IFN-τ保留了Ⅰ型干扰素抗病毒、抗增殖和免疫调节的活性。然而，IFN-τ却并不是典型的Ⅰ型干扰素，因为一方面它不具备病毒感染诱导活性，另一方

面它也没有典型的种属特异性。从应用的角度而言，IFN-τ 最突出的特点就在于它无毒，即使高浓度下使用也很安全。因此 IFN-τ 极具临床应用价值，但目前还处于临床实验阶段。

8.3　白　介　素

白介素代表了另一类细胞因子家族。研究人员已对至少 19 种白介素进行过深入的研究，主要生物学特性见表 8.4。所有白介素都是多肽类调节因子，它们通过结合敏感细胞的表面受体从而发挥其生物学活性。部分白介素是糖基化蛋白，但是将几种糖基化白介素（例如 IL-2 和 IL-3）的糖链去除之后对其生物学活性却没有显著的影响。白介素还具备普通细胞因子所缺乏的其他特性。多数白介素可以由不同类型的细胞合成，并且显示出多效性（例如促进多种、独特的但通常无关的生物学效应）。尽管如此，白介素主要还是由免疫系统的细胞产生，并且主要负责调控免疫。另外，白介素具有功能冗余性（例如几种白介素可以独立地促进机体产生一些相似的或者相同的效应）。尽管有少数白介素具有内分泌活性，但大多数白介素是通过旁分泌-自分泌的方式发挥功能。

表 8.4　人白介素的分子质量、来源和主要生物学活性概要

名　称	分子质量/ku	主要生产细胞	主要生物学活性
IL-1α	17.5	成纤维细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、NK 细胞、血管内皮细胞	活化 T 细胞、内皮细胞和单核细胞；促进抗体的合成，诱导成纤维细胞的增殖
IL-1β	17.3	成纤维细胞、平滑肌细胞、角质形成细胞	促进急性期蛋白质合成
IL-2	15～20	T 淋巴细胞	促进 T 细胞、B 细胞、淋巴细胞、NK 细胞、单核细胞、巨噬细胞和少突神经胶质细胞的生长和分化
IL-3	14～30	活化 T 细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞	造血生长因子
IL-4	15～19	T 细胞、肥大细胞	T 细胞、B 细胞的生长和分化；促进 IgE 的合成
IL-5	45(同源二聚体)	肥大细胞、T 细胞、嗜酸性粒细胞	嗜酸性粒细胞的分化
IL-6	26	T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、角质形成细胞、内皮细胞	调节 B 细胞、T 细胞功能、造血和急性期反应
IL-7	20～28	骨髓细胞、脾细胞、胸腺基质细胞	促进幼稚型 B 细胞、幼稚型 T 细胞和成熟型 T 细胞的增殖和分化
IL-8	6～8	多种细胞类型：单核细胞、淋巴细胞、肝细胞、角质形成细胞、成纤维细胞、内皮细胞等	前炎症细胞因子，中性粒细胞趋化黏附和激活因子
IL-9	32～39	活化的淋巴细胞、成纤维细胞、肝细胞	增强 T 细胞和肥大细胞的增殖
IL-10	35～40	活化的 T 淋巴细胞	刺激 B 细胞增殖、胸腺细胞和肥大细胞；刺激 B 细胞生产 IgA
IL-11	23	经 IL-1 激活的成纤维细胞	造血生长因子
IL-12	75～80	B 细胞、单核细胞、巨噬细胞	协同刺激淋巴细胞的增殖、增强 NK 细胞活性、诱导 T 细胞和 NK 细胞生产 IFN-γ
IL-13	17	活化的 T 细胞	促进 B 细胞的增殖，抑制前炎症细胞因子的生产
IL-14	60	T 淋巴细胞	增强活化 B 细胞的增殖，抑制免疫球蛋白的合成
IL-15	14～15	上皮细胞、单核细胞、骨骼肌、胎盘、肺、肝脏、心脏	与 IL-12 类似

目前，已有一些白介素（譬如 IL-2、IL-3）制剂投入临床应用，同时还有一些白介素正进行临床评估（表 8.5）。

表 8.5 目前已获批准应用于临床或者已进入临床试验的部分白介素制剂

白介素	适应症	状况
rhIL-2(Proleukin)	肾细胞癌、黑色素瘤	已获批准(1992)
rhIL-11(Neumega)	用于预防因化疗引起的血小板减少症	已获批准(1997)
rhIL-4	肿瘤，风湿性关节炎	试验阶段
rhIL-6	血液病，肿瘤	试验阶段
rhIL-12	肿瘤，传染病	试验阶段

8.3.1 白介素 2

白介素 2（IL-2）可以说是最具代表性的白介素，又称为 T 细胞生长因子，是一种单链糖基化多肽，分子质量在 15～20ku 之间。该分子包含 133 个氨基酸残基，包含四个主要的和两个次要的 α 螺旋区域并按反向平行的方式排列，从而使其亲水区能够直接朝向周围富水的环境。对 IL-2 分子晶体结构的分析也证实了该分子缺乏任何 β 构像序列。IL-2 含有一个链内二硫键，连接 58 位和 105 位的半胱氨酸，这种结构系维持生物活性所必需。IL-2 的等电点在 6.5～6.8 之间。人 IL-2 的编码基因由 4 个外显子和 3 个内含子构成。

IL-2 在正常的免疫机能中发挥关键的作用，参与调节先天性免疫和获得性免疫的许多方面（见信息框 8.1）。IL-2 由受某种抗原或者有丝分裂原活化的 T 淋巴细胞合成和分泌。随后进一步刺激活化 T 细胞和 B 细胞的生长和分化。另外，IL-2 还能加强 NK 细胞、单核细胞以及巨噬细胞的活性。当与抗原相结合，IL-2 就成为具有诱导某种抗原特异性免疫反应的初级效应分子，这与 MacFarlane-Burnet 克隆选择学说的观点相符。MacFarlane-Burnet 准确地预测并指出，正常的机体内存在大量的淋巴细胞，每一个细胞都能特异地识别机体可能遇到的某种抗原，而这种与特定淋巴细胞相对应的抗原可以诱导特定淋巴细胞产生大量的克隆，进而使免疫系统启动针对这种抗原的快速和特异的免疫反应。当相同的抗原再次进入机体，某些抗原物质再次被巨噬细胞吞噬。随后，这些细胞将这些抗原物质的片段递呈到细胞表面，这也正是“抗原递呈细胞”的由来。少量的循环 T 细胞通过特殊的细胞表面受体识别并结合递呈在细胞表面的抗原片段。这种抗原特异细胞通过克隆选择获得大量的增殖，而其他没有识别抗原的细胞将保持在静止状态。而这种 T 细胞的生长和分化不仅依赖于抗原的存在，还需要 IL-1，而 IL-1 由活化的巨噬细胞产生。活化的辅助性 T 细胞可以产生刺激 T 细胞进一步分化的 IL-2。在与抗原和 IL-6 同时作用之下，IL-2 还能协同刺激 B 淋巴细胞的增殖（能产生与外源基团选择性结合的抗体）。活化的 B 细胞和 T 细胞都表达 IL-2 受体，而静止期的淋巴细胞通常没有 IL-2 受体。

信息框 8.1 先天性免疫和获得性免疫

高等动物采用不同的机制来保护其免受微生物和其他外来物质的感染。一般而言，这些保护机制分为两类：先天性免疫（也称为自然免疫）和获得性免疫。先天性免疫是一种组成型免疫，与生俱来。它是非特异的（譬如，它并非病原或者抗原特异的，对威胁机体的所有物质都起作用）。此外，先天性免疫并不会因暴露于外源物质而被增强或者放大。先天性免疫的基本特征包括如下两方面。

1. 物理化学屏障，诸如皮肤和黏膜、胃酸、消化酶类、小肠胆汁和阴道内的低 pH。这些屏障具有抵御病原侵入机体和在体内定植之前将其清除的功能。

2. 噬菌作用，指吞噬细胞（一类特殊的防御细胞）摄入并破坏微生物和其他外来颗粒的功能。吞噬细胞包括巨噬细胞、单核细胞、多核型白细胞（polymorphonuclear leukocytes，PMN）和自然杀伤细胞（另见信息框 8.2）。

获得性免疫是诱导型免疫机制，仅见于脊椎动物。它通过接触外源物质或抗原诱导产生。获得性免疫是抗原特异性的，并且当机体持续或者再次接触同一抗原时这种免疫反应将随之急剧增强。它主要受 T 淋巴细胞（细胞免疫）和产生抗体的 B 淋巴细胞（体液免疫另见信息框 8.2）调控。

与多数淋巴细胞不同的是 NK 细胞可以持续地表达 IL-2 受体。当 IL-2 与受体结合将会诱导 NK 细胞的增殖。另外 IL-2 还能刺激 NK 细胞产生和分泌大量、多样的细胞因子，包括肿瘤坏死因子、IFN-γ 和集落刺激因子。这些细胞因子又能进一步增强机体产生全面的免疫学反应。NK 细胞大约占循环淋巴细胞数量的 10%，在抗肿瘤和抗病毒感染的免疫反应中发挥重要作用（信息框 8.2）。

信息框 8.2　生物学功能受白介素和其他细胞因子调控的一些细胞类型

星形胶质细胞：位于中枢神经系统，可能为神经元提供营养。

嗜曙红细胞：一种具有吞噬颗粒物质的多核型白细胞，参与过敏反应。

表皮细胞：位于皮肤最外层。

成纤维细胞：位于结缔组织，生产结缔组织的基质以及胶原和弹性纤维的前体。

造血细胞：骨髓干细胞，各种血细胞都由它分化而来。

角质细胞：能够产生角质的任何表皮细胞。

白细胞：各种有核血细胞。

B 淋巴细胞：抗体产生白细胞，调节体液免疫。

T 淋巴细胞：负责细胞介导免疫的白细胞。

巨噬细胞：主要存在于结缔组织的吞噬细胞，功能类似于单核细胞。

肥大细胞：含有组氨酸、肝磷脂和 5′-羟色胺颗粒的细胞，位于结缔组织，炎症和过敏反应时能释放颗粒。

单核细胞：能够吞噬和破坏外源颗粒（诸如细菌、组织碎片）的白细胞。

自然杀伤细胞（natural killer，NK）：能够杀伤肿瘤细胞和病毒感染细胞的白细胞。

平滑肌细胞：能够产生缓慢、持续收缩同时又不引起知觉的肌细胞，主要存在于中空的器官（肠、胃、膀胱和血管）。

血管内皮细胞：沿血管排列的单层细胞。

研究者对 IL-2 受体进行了深入的研究。研究表明这种高度亲和的受体由 3 种不同的跨膜多肽链构成，相互之间以非共价键结合（图 8.2）。较小的受体亚基（α 链）的分子质量为 55ku，由 3 个片段组成：一个较大的细胞外 IL-2 结合结构域、一个跨膜结构域和一个由 13 种氨基酸构成的细胞内结构域。较大的 IL-2 受体亚基（β 链）的分子质量为 75ku，也是由

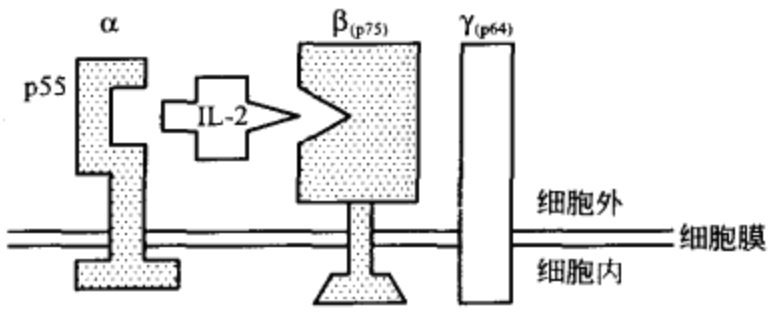


图 8.2　白介素 2 受体

详情请参阅参考文献

胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域 3 部分构成。但不同的是，此亚基的胞内结构域比较大，由 286 个氨基酸构成，是受体分子结合 IL-2 之后启动细胞内反应的功能域。受体的第三种亚基（γ链）分子质量 64ku，是一种糖基化跨膜蛋白。此亚基虽然与 IL-2 没有直接作用，但在信号传导的过程中是必需的。另外，γ多肽也是 IL-4，IL-7，IL-9，IL-13 和 IL-15 受体的组成成分。

尽管酪氨酸激酶活性可能在 IL-2 的信号传导的过程中具有重要作用，但信号传导如何得以完成的确切机制还未阐明。IL-2 分子含有两个受体结合位点，一个位点可以识别并结合受体的α亚基，另一个位点结合β亚基，如图 8.2。不同的研究结果都表明 IL-2 与两种受体亚基结合后，在亲和性和动力学上都存在巨大的差异。IL-2 与α亚基（55ku）相结合时的结合-解离常数和扩散常数非常接近，而与此相反的是，IL-2 与β亚基（p75）结合时则具有较高的亲和性和较低的结合-解离比值。这两种结合特性相组合造就了 IL-2 受体的高亲和性。

8.3.2　白介素 2 的生产和医疗用途

活化的辅助性 T 细胞可以分泌少量的白介素 2（IL-2），几种肿瘤细胞系（譬如 Jurkat 白血病细胞系）的产量较高一些。这些细胞生产的 IL-2 主要应用于早期的研究，远不能满足临床大量应用的需求。重组 DNA 技术的应用使得 IL-2 无限量的大规模生产变的不再困难。天然的人 IL-2 基因和 cDNA 都可以用于重组蛋白的生产。并且这些重组蛋白展现出与天然 IL-2 相同的一些生物学活性。尽管天然的 IL-2 通常是糖基化的，然而大多数商品化的重组蛋白都是用大肠杆菌生产的，缺乏糖基链，但这似乎对重组产品的生物学活性并没有不利的影响。

IL-2 应用于一些肿瘤的治疗已有较长时间（表 8.5）。目前，更多的临床试验也已启动，目的在于评价 IL-2 用于一些包括艾滋病在内的感染性疾病治疗的潜在价值。IL-2 之所以可以用于这些病症的治疗，原因在于它不仅能增强 B 细胞和 T 细胞反应，还能够动员 NK 细胞。20 世纪 80 年代的动物实验发现，当将 NK 细胞从体内分离出来后经 IL-2 活化处理，然后再同一定量的 IL-2 一起输回体内竟可以使肺癌消退！

由于 IL-2 在活化的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的克隆扩增过程中发挥关键的作用，因此它也有成为免疫佐剂的可能。许多常规佐剂会刺激机体产生一系列无法解释的副作用，因此难以适用于人类，更令人遗憾的是，这些佐剂通常是最有效的。佐剂主要通过促进巨噬细胞活化从而达到加强免疫的效果。活化的巨噬细胞释放 IL-1，它又可以再次诱导巨噬细胞产生一系列其他种类的细胞因子，首先是 IL-2。随后，IL-2 再激发产生一系列免疫学反应。因此这种直接调控 IL-2 的策略有可能成为佐剂开发的一种新途径。

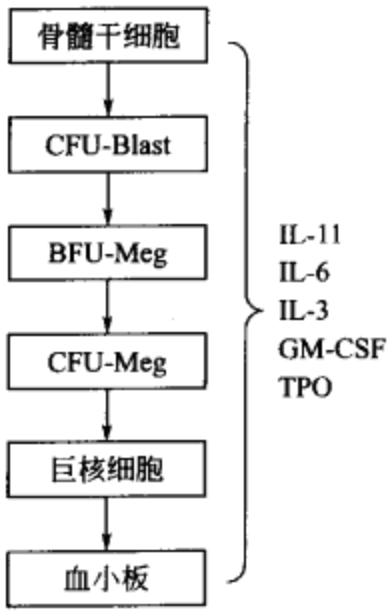
对 IL-2 分子和其作用模式的理解使得研究者可以从理论上操纵 IL-2 介导的免疫反应。比如这些理论已经促进产生了许多独创性的方法，而这些方法已在临床上应用于诱导选择性的免疫抑制。这种治疗手段对同种异体移植物的存活或者自身免疫病的治疗都具有重要的意

义。同种异体移植物，是指由供体移植到受体的器官或组织，由于携带外源抗原所以能被受体识别为非自身，而受体则会启动免疫反应从而导致免疫排斥发生。迄今为止，阻止免疫排斥最常用的方法就是采用药物（比如糖皮质激素和环孢霉素）诱导受体产生广泛性的免疫抑制。这些药物的功能就在于抑制 IL-2 的产生。

选择性的免疫抑制可以通过多种方式诱导产生。IL-2 受体只表达在活化的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞表面，因此可以采用 IL-2-毒素结合的方式导致活化淋巴细胞被选择性地破坏。除此之外，单克隆抗体与 IL-2 受体特异性地结合并不激发细胞内反应的特性也可以作为一种选择方案。上述单克隆抗体可以阻断 IL-2 的结合并且由此阻断了 IL-2 介导的活化白细胞的增殖效应。可溶性的 IL-2 受体已经获得生产，将其注射给药能够限制或阻止正常 IL-2 的功能，因为它们可以与 IL-2 受体竞争结合 IL-2。其他用来增强临床免疫抑制的策略还包括开发 IL-2 的类似物，该类似物能够结合 IL-2 受体但又不能激发细胞产生相应的反应。选择性的免疫增强作用当然也可以通过外源的 IL-2 诱导产生。由于 IL-2 类似物表现出较强的免疫刺激作用，因此它也具有较高的开发应用潜力。

8.3.3　白介素 11

人白介素 11（IL-11）是一分子质量为 23ku 的多肽分子，主要由成纤维细胞和骨髓干细胞产生。它是一种刺激血小板形成的造血生长因子（图 8.3）。人 IL-11 的 cDNA 编码序列于 1991 年首次分离得到，并由此推断出它的氨基酸序列。IL-11 的三级结构分别由 4 个 α 螺旋和 2 个 β 折叠构成，目前 IL-11 的 cDNA 已经在很多重组表达系统中获得表达。



干细胞在不同组合的细胞因子的影响之下发生分化，从而形成红细胞、白细胞或血小板。此过程即造血作用。在此简要叙述血小板形成的过程。原始巨核细胞是血小板发育系列的始祖细胞。血小板形成的过程实际上是一种膜结合颗粒出芽的过程，这些颗粒（血小板）随后进入血液循环。一种细胞因子的组合物可以刺激血小板的产生。白介素和 GM-CSF 似乎可以依次促进早期细胞的分化，而 TPO 则主要促进血小板产生的后期阶段。典型的细胞因子冗余可能导致这些调节因子在血小板产生的前后过程中表现出活性重叠

注：IL，白介素；GM-CSM，粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子；TPO，血小板形成素；CFU，空斑形成单位；BFU，突发形成单位

图 8.3　骨髓干细胞分化成为血小板示意图

由大肠杆菌工程菌生产的重组人 IL-11（rhIL-11）目前已经获准用于治疗和预防化疗诱导产生的血小板减少症，该病以血小板数量低为明显特征。化疗常能引起血小板减少症是由于干细胞对化疗药物相对敏感的缘故。在 IL-11 获准应用于该病的治疗之前，唯一的治疗手段就是直接移植血小板，但这通常具有一定的输液感染风险。

8.3.4　白介素 1

多种细胞可以产生白介素 1（IL-1，表 8.4），尤以巨噬细胞和单核细胞等吞噬细胞为

主。实际上存在两种 IL-1s，IL-1α 和 IL-1β。尽管这两种 IL-1 由两种截然不同的基因所编码，并且只具有有限的同源性，但是它们却可以结合相同的受体并引发相同的生物学反应。IL-1α 和 IL-1β 最初都以分子质量为 31ku 的前体形式合成，这些前体经过蛋白酶裂解后产生分子质量为 17.5ku 的活性分子。IL-1α 的等电点在 5.5 左右，而 IL-1β 的等电点则接近 7.0。

目前已经发现两种 IL-1 受体，分别是Ⅰ型 IL-1 受体和Ⅱ型 IL-1 受体。其中Ⅰ型受体主要分布在 T 细胞和成纤维细胞的表面。Ⅱ型受体则主要分布在 B 淋巴细胞上。IL-1α 和 IL-1β 都能结合这两种受体。

IL-1 具有广泛的生物学活性，主要包括：促进胸腺细胞、成纤维细胞、造血细胞、淋巴细胞的增殖；促进创伤愈合；对部分肿瘤细胞系具有抗肿瘤效应；促进炎症；诱导肝脏急性期蛋白质的合成；刺激滑膜细胞释放前列腺素和胶原酶；刺激选定细胞释放其他细胞因子；诱导发热反应；诱导睡眠。因此 IL-1 又被称为细胞因子激活因子、淋巴细胞激活因子、T 细胞置换因子和内源性热原质。

IL-1 促进活化 T 淋巴细胞释放 IL-2，而 IL-1 的多种生物学活性又一定程度上受 IL-2 的调节。另外，IL-1 还参与一些疾病过程，比如可以从关节炎病人的滑液中分离到 IL-1。

IL-1 制剂最初从巨噬细胞上清液中分离获得，再通过细菌脂多糖（lipopoly saccharide，LPS）孵育激活。尽管可以采用这种方法获取少量 IL-1，但要如此进行大规模提取并不实际。

用大肠杆菌克隆、表达 IL-1cDNA 已经能够获得有生物活性的 IL-1。尽管初步的结果有些令人失望，但用以评估 IL-1 除促进创伤愈合以外还能治疗多种肿瘤效果的大规模临床试验，也已在进行之中。

另外，可溶性的 IL-1 受体也在细菌重组表达系统中获得表达。通过注射给药，此 IL-1 可溶性受体能和天然的 IL-1 受体竞争结合 IL-1，并以此降低其生物学效应。这对诸如败血性休克病人十分有益，因为在这种病症的过程当中，IL-1 不恰当和大量地释放会导致一系列的副作用产生。

8.3.5 白介素 4、白介素 6 和白介素 12

人白介素 4（IL-4）是一种 129 个氨基酸组成的酸性糖蛋白，具有多种免疫调节活性。它可以激活 B 淋巴细胞和调节（部分）免疫球蛋白的合成。除此之外，IL-4 还可以诱导活化 T 淋巴细胞（尤其是细胞毒性 T 细胞）和 NK 细胞。而它对后者的效应也正是其应用于治疗癌症的理论基础（信息框 8.2）。IL-4 还具有很强的抗炎症活性，这提示它具有治疗诸如风湿性关节炎等疾病的潜在价值。除了上述特性以外，IL-4 还能调节造血作用，用于治疗时可以使血细胞比容（红细胞在血液中所占的比例）上升 20%。

人类 IL-6 是一种由 183 个氨基酸构成的分子质量为 26ku 的糖基化蛋白，由多种细胞产生（表 8.4）。这种细胞因子在抵抗传染病和炎症过程中发挥关键作用，而此炎症通常由协同刺激 T 淋巴细胞以及诱导抗体分泌和急性期蛋白质产生（在清除病原菌时发挥重要作用）等引起。有报道表明使用 IL-6 在体外试验中可以诱导免疫介导的抗肿瘤效应，并已进入临床试验。IL-6 还具有造血活性，它可以促进血小板显著的增加（增长 20%），还可以提高 T 细胞和 B 细胞的数量。同样，一些研究 IL-6 治疗造血疾病的临床试验已经启动。

人 IL-12 是一种分子质量为 75～80ku 的异源二聚体蛋白，分别由 35ku 和 40ku 的两个

亚基组成。异源二聚体分子的大小由各亚基的糖基化程度所决定。IL-12 功能广泛，一方面它可以促进 NK 细胞和 T 细胞的细胞溶解活性；另外，它还能增强体液免疫和促进多种诸如 TNF、IFN-γ 等前炎症细胞因子的分泌。而 IL-12 所具有的广泛的免疫调节活性赋予它潜在的临床价值。目前研究人员已经开展评估 IL-12 对感染性疾病和癌症治疗效果的研究。

8.4　肿瘤坏死因子

肿瘤坏死因子（tumour necrosis factor，TNF）是细胞因子家族中的传统成员。现已发现两种 TNF，即 TNF-α 和 TNF-β。尽管这两种分子能够结合相同的受体，并且可以诱导产生广泛且类似的生物学反应，但它们却是两种截然不同的分子，而且同源性低于 30%。尽管前者最初被命名为“肿瘤坏死因子”，并且仍被称之为 TNF，但 TNF-α 的提法更为合适，它也称作恶液质素。TNF-β 又称作淋巴毒素。表 8.6 简要介绍了 TNF-α 和 TNF-β 的物理化学性质。

表 8.6　TNF-α 和 TNF-β 的物理化学性质概况

性　质	TNF-α	TNF-β
氨基酸数量	157	171
分子质量/ku	52①	25
糖基化	无	有
二硫键	1	0
p*I*	5.6	5.8

① 活性形式的人 TNF-α 分子是同源三聚体，单体无活性，分子质量 17.3ku。

8.4.1　α 肿瘤坏死因子

α 肿瘤坏死因子（TNF-α）终于在 19 世纪末由一名为 William Coley 的美国外科医生偶然发现。他注意到一些癌症患者在感染了严重的细菌疾病后，肿瘤会消退甚至消失。Coley 因此考虑尝试用活菌来治疗他的病人。然而在当时尚未有抗生素出现，这种方法不仅无法控制继发感染，还会引起其他一些严重的不良后果。这些困难最后得以解决是因为 Coley 发明了一种以灭活细菌悬液为成分的疫苗，称之为 Coley 毒素。一些癌症患者采用这种毒素治疗方法获得了成功。但由于治疗效果始终不稳定，因此这种疗法逐渐被淘汰了。

后来人们发现 Coley 毒素的活性成分是一种名为 LPS 的复合分子。这种分子与革兰阴性菌的细胞外膜相关。它由脂质和多糖构成，也称为内毒素。

LPS 自身没有抗肿瘤活性。研究者发现注射过 LPS 的动物血清中含有一种对肿瘤细胞有毒性的因子。此因子由对 LPS 发生反应的特定细胞所产生，因此称之为肿瘤坏死因子（坏死指细胞死亡）。LPS 是最有效的 TNF-α 刺激物。

TNF-α 由多种类型的细胞合成，除了脑和肝脏细胞外，尤以活化的巨噬细胞、单核细胞、某些 T 细胞和 NK 细胞为突出。尽管 LPS 是最有效的 TNF-α 诱生剂，但其他诸如部分病毒、真菌和寄生虫等也能刺激 TNF-α 的合成与释放。甚至，TNF-α 能以自分泌的方式刺

激其自身的产生。

天然的人 TNF-α 分子是一种同源三聚体，由三条相同的多肽亚基紧密联系构成一个三折轴对称的结构。这种排列模式有些类似部分病毒的衣壳蛋白亚基。TNF-α 的多肽亚基是非糖基化的，包含 157 个氨基酸；分子质量为 17.3ku，并包含一个链内二硫键。对 TNF-α 单体晶体的 X 射线衍射研究结果显示，此分子呈拉长状。序列中的大多数氨基酸主要参与形成两个 β 折叠，而每个折叠结构又包含 5 个反向平行的 β 链。人 TNF-α 首先以一个 233 个氨基酸前体分子的形式合成。将第 76 位氨基酸蛋白裂解位点的信号肽去除之后，就可以释放出天然的 TNF-α。另外，TNF-α 还存在一种分子质量为 26ku 的膜结合形式。

8.4.2 α 肿瘤坏死因子的生物学效应

α 肿瘤坏死因子（TNF-α）通过结合易感细胞表面的特定受体而诱导产生相应的生物学效应。目前已经发现了两种 TNF-α 受体。受体 TNF-R55 分子质量为 55ku，而受体 TNF-R75 的分子质量约为 75ku。这两种受体序列同源性低于 25%。TNF-R55 受体呈现在多种细胞表面，而Ⅱ型受体的分布相对有限。它们都是跨膜糖蛋白，都包含一个胞外结合结构域、一个疏水结构域和一个胞内效应结构域。

TNF-α 诱导产生效应的确切分子机制仍然有待进一步阐明。TNF-α 与受体相结合导致受体的寡聚化，通过 G 蛋白的调节作用活化腺苷酸环化酶、磷脂酶 A_2 和蛋白激酶，还可以激发其他一系列事件。TNF-α 诱导产生的具体生物学效应可能因细胞种类的不同而改变。其他因素，比如其他细胞因子的存在会改变一些属于 TNF-α 对敏感细胞的作用。TNF-α 的主要生物学效应为：激活多种吞噬细胞；直接或者间接促进炎症反应；对多种转化细胞具有细胞毒性；诱导多种其他细胞因子的合成与释放，包括 IL-1，IL-6，IL-8 和集落刺激因子；系统地调节败血性休克、恶病质，并可能（部分）调节多种自身免疫病。

在正常情况下，TNF-α 产量较低，并且以旁分泌-自分泌的方式调节其产量。它在一些诸如炎症和免疫反应等严重的生理过程之中扮演关键的角色。TNF-α 通过激活大量的吞噬细胞从而直接上调非特异免疫；它还能通过促进一系列的细胞因子的合成和释放来间接影响其他免疫反应的元件。它可以直接地促进（例如活化中性粒细胞和其他前炎症白细胞）或间接地促进（例如促进前炎症细胞因子的合成）炎症反应。TNF-α 这种前炎症反应活性以及其特别能够刺激天然免疫和获得性免疫的多种元件的特性，构成了 TNF-α 对不同转化细胞的细胞毒效应的分子基础。然而，现在看来，TNF-α 诱导肿瘤细胞坏死的活性只是这种分子相对次要的生物学效应而已。

不同的病症（例如严重的微生物感染）能够激发 TNF-α 的过量表达。在这种情形之下，TNF-α 进入血液循环并以类似内分泌的形式发挥功能。这种系统（整个机体与局部相对比）效应主要会对机体健康产生负面的影响。

败血性休克是一种严重的病症，往往和革兰阴性菌感染相关。这些革兰阴性菌外膜上的 LPS 分子在败血性休克的发展过程中发挥关键的作用。如前所述，LPS 是目前已知最有效的 TNF 诱生剂，而临床研究表明应用外源 TNF-α 诱导产生的症状和那些罹患败血性休克的病人的症状相同。进一步实验表明，采用抗 TNF-α 抗体进行预先治疗，可以保护实验动物免受高剂量 LPS 的致死性攻击。

TNF-α 持续高水平的不正常表达有可能发展成恶病质，而这种消耗性综合病症通常与慢性寄生虫病、某些传染病和癌症有关。

8.4.3　α 肿瘤坏死因子的医疗用途

TNF-α 已经被克隆，并在大肠杆菌中获得表达。重组 TNF 已经可以大量纯化并且具有生物学活性，这使得 TNF 对一些病症的临床评估更加容易，尤其是对癌症的治疗实验。许多实验或单独采用 TNF-α 或结合 TNF-γ 进行治疗，但结果却令人失望。

研究者对 rhTNF-α 的应用进行了系统的实验。当在正常的治疗剂量时，TNF-α 会诱导产生广泛的令人难以承受的副作用。然而，当高剂量的 TNF-α 与化疗相结合时，研究人员发现这种方法对某些影响肢体的癌症有疗效。由此，研究者通过外科手术将病肢从根部截取下来，再用 TNF-α 灌注处理断肢。由于不存在 TNF-α 进入循环系统的风险，从而阻止了系统毒负效应的产生，因此这种所谓的离体断肢灌注技术使得在局部应用高浓度的 TNF-α 成为可能。“Beromun”是大肠杆菌生产的 rhTNF-α 的商品名，已经应用于上述治疗方法之中。图 8.4 概述了此重组产品的生产过程。

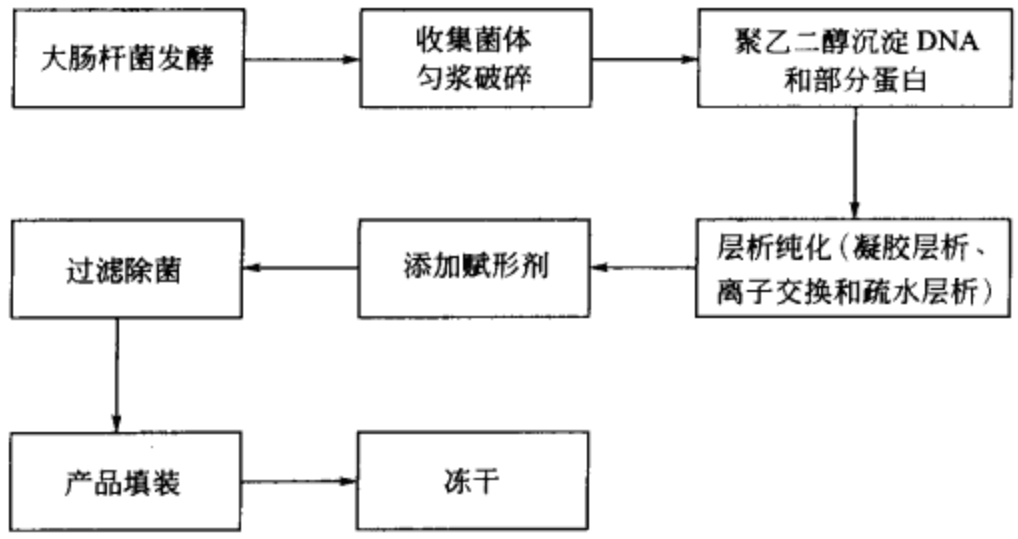


图 8.4　应用大肠杆菌工程菌生产 rhTNF-α（Beromun）的简要流程

8.4.4　β 肿瘤坏死因子

β 肿瘤坏死因子（TNF-β）过去又称为淋巴毒素，其实比 TNF-α 发现的要早，但当时并未称之为 TNF。TNF-β 由活化的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞产生，是一种 171 个氨基酸构成的糖基化蛋白。尽管 TNF-α 和 TNF-β 仅有有限的序列同源性，但它们能结合相同的受体并展现出类似的生物学活性。TNF-β 的 cDNA 已被克隆并在大肠杆菌中获得表达。由于能够大量生产，因此研究者可以深入、全面地对 TNF-β 的生物化学性质和临床价值进行研究。

8.5　集落刺激因子

健康个体的血清中含有三种白细胞：淋巴细胞，粒细胞和单核细胞。淋巴细胞又可以分为 B 细胞和 T 细胞，它们的功能是分别促进体液免疫和细胞免疫。粒细胞可以细分为嗜碱性粒细胞、

中性粒细胞和嗜酸性粒细胞，能够识别和破坏细菌和其他一些外源颗粒（信息框 8.1），有些细胞还参与过敏反应。而单核细胞除了吞噬并清除组织碎片，也能吞噬和清除一些外源颗粒。

如前所述，所有循环系统血细胞都由一种细胞即骨髓造血干细胞分化产生。骨髓造血干细胞在多种造血生长因子的刺激下发生增殖和分化，并最终形成各种各样的血细胞（图 8.5）。

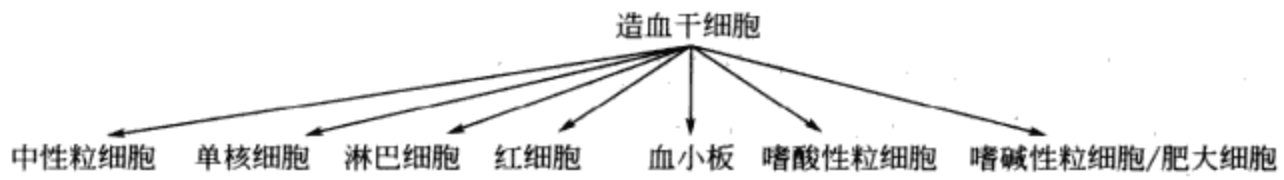


图 8.5 由造血干细胞衍生而来的不同血细胞

集落刺激因子的主要功能在于促进一些由干细胞衍生而来的特定前体细胞的增殖和分化，最终产生成熟的粒细胞和巨噬细胞。这两类细胞在机体抵抗各种病原入侵的过程中发挥重要作用。任何能导致循环系统中这些细胞数量减少的因素都会导致机体对传染病易感。

所谓集落刺激因子即具有促进体外培养的各种白细胞生长形成团块或者集落特性的一类细胞因子。目前已经鉴定并研究了多种 CSF（表 8.7），包括粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（granulocyte-macrophage CSF，GM-CSF），粒细胞集落刺激因子（granulocyte CSF，G-CSF），巨噬细胞集落刺激因子（macrophage CSF，M-CSF）和多潜能集落刺激因子（multi-CSF），即 IL-3。

表 8.7 人集落刺激因子的种类、来源、分子质量

名　称	构　成	分子质量/ku	来　源
GM-CSF	127 个氨基酸，单链糖蛋白	22	T 细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞
G-CSF	177 个氨基酸，单链糖蛋白	21	巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞
M-CSF	522 个氨基酸，二聚体糖蛋白	90	多种细胞
Multi-CSF(IL-3)	133 个氨基酸，单链糖蛋白	14～30	活化的 T 细胞、肥大细胞、嗜曙红细胞

不同种类集落刺激因子之间的氨基酸序列同源性都很低。所有 4 种亚类集落刺激因子的受体都已被发现，它们都是包含结合配体的胞外结构域、跨膜片段和胞内效应结构域的跨膜糖蛋白。尽管可能存在其他机制，但 CSF 主要通过酪氨酸磷酸化进行信号传导。

GM-CSF 具有造血活性，特别是能够促进粒细胞和单核细胞的增殖、分化和活化。同时，它也可以作为 T 细胞、内皮细胞和巨核细胞的生长因子。而 G-CSF 是中性粒细胞以及其前体细胞的生长、分化和活化因子，这些细胞在循环系统的寿命很短（6～8h），通常以 70000 个/s 的速度更新。G-CSF 还能促进内皮细胞的生长。M-CSF 则可以刺激巨噬细胞的分化和活化。

集落刺激因子的生产和医疗用途

重组 DNA 技术的出现使 CSF 的大规模生产成为现实。在许多情况下，翻译后糖基化修饰对维持重组蛋白的生物学活性并没有必要。因此用原核表达系统生产的 CSF 可能直接运用于临床。重组 CSF 也能够用哺乳动物细胞表达系统获得生产，这种表达系统的优点是可以进行翻译后修饰，尤其是可以糖基化。

GM-CSF 已经在多种重组表达系统中获得了表达，其中最值得关注的是 CHO 表达系统和酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）表达系统。Leukine（sargramostim）就是一种用酵母工程菌生产的重组蛋白，并于 1991 年获得 FDA（美国食品及药物管理局）批准上市。它和天然的人 GM-CSF 不同在于糖基化模式和包含一个第 23 位的亮氨酸。但它具有和天然

细胞因子同样的体内生物活性。目前 Leukine 主要应用于自体骨髓移植病人，以促进骨髓细胞（由骨髓衍生来）的恢复。

Neupogen 是一种重组 G-CSF，由大肠杆菌工程菌生产而来，它于 1991 年获准上市，主要适用于治疗化疗引起的嗜中性白细胞减少症（嗜中性白血球减少症是一种以血液嗜中性白细胞减少为特点的病症，导致对传染病易感）。

8.6　细胞因子毒性

许多与感染相关的病症或者其他一些病情通常都会导致循环细胞因子水平的上升。食欲下降、疼痛、颤抖和疲劳等流感病症都是由于 IFN 和其他细胞因子水平全面上升引发的结果，而这些细胞因子的释放都是免疫系统细胞对感染产生的反应。因此并不感到奇怪的是当对病人进行多种细胞因子治疗研究时，许多上述症状都能被复制出来。尽管较高剂量的细胞因子制剂对人是安全的，但细胞因子的不良反应往往限制其无法较高剂量的应用。从而进一步影响到这些产品的治疗效果。表 8.8 列出了不同细胞因子相关的不良反应。更严重的不良反应可能是致命的，但在已获准上市的产品中相对少见。接受重组细胞因子治疗的病人必须接受仔细的治疗观察，一旦出现比较严重的不良反应就应推迟或者撤销治疗。

表 8.8　因使用特定细胞因子而产生的不良反应

细胞因子	反　应
Ⅰ型 IFN	类似流感症状（肌肉疼痛、发烧、寒战、虚弱、头痛、恶心），呕吐、皮疹、腹泻、血管扩张、精神病症状（抑郁、焦虑）、厌食
IL-2	类似流感症状、腹泻、呕吐、皮疹、呼吸道并发症、心血管并发症（高血压、血管扩张、心率过快）、精神病症状（精神混乱、焦虑）
IL-1	类似流感症状、水肿、头痛、恶心、腹痛、心脏和肾脏并发症、精神混乱
G-CSF	骨痛、毛细血管渗漏综合征
TNF-α	疼痛、恶心、呕吐、寒战、肝毒性、心律不齐

8.7　进一步的阅读资料

图书

Balkwill, F. (2000) *Cytokine Network*. Oxford University Press, Oxford.

Bonivada, B. (1990) *Tumour Necrosis Factor*. Karger, Basel.

Fiers, W. (1993) *Tumour Necrosis Factor*. Karger, Basel.

Garland, J. *et al*. (1997) *Colony-stimulating Factors in Molecular and Cellular Biology*. Marcel Dekker, New York.

Lindenmann, J. (1999) *Interferons*. Springer-Verlag, Godalming.

Maroun, J. (1992) *Colony-stimulating Factors in Clinical Practice*. Royal Society of Medicine, London.

Medcalf, D. (1995) *Haemopoietic Colony-stimulating Factors*. Cambridge University Press, Cambridge.

Mire-Sluis, A. (1998) *Cytokines*. Academic Press, London.

Thomson, A. (1998) *Cytokine Handbook*. Academic Press, London.

论文

干扰素

Allen, G. (1982) Structure and properties of human interferon-α from Namalwa lymphoblastoid cells. *Biochem. J.* **207**, 397-408.

Allen, G. & Fantez, K. (1980) A family of structural genes for human lymphoblastoid (leukocyte-type) interferon. *Nature* **287**, 408-411.

Aringer, M. *et al.* (1999) Interferon/interleukin signalling, a 1999 perspective. *Immunologist* **7** (5), 139-146.

Borden, E. *et al.* (2000) Second generation interferons for cancer; clinical targets. *Semin. Cancer Biol.* **10** (2), 125-144.

Cosman, D. *et al.* (1990) a new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **15** (7), 265-270.

Goodbourn, S. *et al.* (2000) Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* **81**, 2341-2364.

Gray, P. *et al.* (1982) Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli*, and monkey cells. *Nature* **295**, 503-508.

Kerr, I. & Stark, G. (1991) The control of interferon inductible gene expression. *FEBS Lett.* **285** (2), 194-198.

McCarty, M. (2000) Interferons in dermatology. *Curr. Prob. Dermatol. US* **12** (6), 260-264.

Nagata, S. *et al.* (1980) Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature* **284**, 316-320.

Pestka, S. *et al.* (1987) Interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 727-777.

Platanias, L. & Fish, E. (1999) Signalling pathways activated by interferons. *Exp. Hematol.* **27** (11), 1583-1592.

Taniguchi, T. *et al.* (1980) Expression of the human fibroblast interferon gene in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77** (9), 5230-5233.

白介素

Auron, P. (1998) The interleukin-1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9** (3-4), 221-237.

Kaplan, G. *et al.* (1992) Rational immunotherapy with interleukin-2. *Bio/Technology* **10**, 157-162.

Kronheim, S. *et al.* (1986) Purification and characterization of human interleukin-1 expressed in *E. coli*. *Bio/Technology* **4**, 1078-1082.

Maliszewski, C. & Fanslow, W. (1990) Soluble receptors for IL-1 and IL-4: biological activity and therapeutic potential. *Trends Biotechnol* **8**, 324-329.

Nelson, B. & Willerford, D. (1998) Biology of the interleukin 2 receptor. *Adv. Immunol.* **70**, 1-81.

Scott, P. (1993) IL-12: Initiation cytokine for cell mediated immunity. *Science* **260**, 496-497.

Smith, K. (1988) Interleukin-2, inception, impact and implications. *Science* **240**, 1169-1176.

Smith, K. (1990) Interleukin-2. *Sci. Am.* **262** (3), 26-33.

Trinchieri, G. (1998) Interleukin 12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv. Immunol.* **70**, 83-243.

Waldmann, T. (1989) The multi-subunit interleukin-2 receptor. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 875-911.

肿瘤坏死因子

Aggarwal, B. (2000) Tumor necrosis factor (TNF): A double edged sword. *J. Clin. Ligand Assay* **23** (3), 181-192.

Camussi, G. *et al.* (1991) The molecular action of tumor necrosis factor-α, *Eur. J. Biochem.* **202**, 3-14.

Fiers, W. (1991) Tumor necrosis factor. *FEBS Lett.* **285**, 199-212.

Moreland, L. (1999) Recent advances in anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis-focus on the soluble TNF receptor p75 fusion protein, etanercept. *Biodrugs* **11** (3), 201-210.

Old, L. (1988) Tumor necrosis factor. *Sci. Am.* **258**, 41-49.

Sprang, S. (1990) The divergent receptors for TNF. *Trends Biochem. Sci.* **15** (10), 366-368.

集落刺激因子

Bourette, R. & Rohrschneider, L. (2000) Early events in M-CSF receptor signalling. *Growth Factors* **17** (3), 155-166.

Hartung, T. (1999) Immunomodulation by colony stimulating factors. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **136**, 1-164.

Plugariu, C. & Williams, W. (2000) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) antagonists: design and potential application. *Drugs Future* **25** (12), 1295-1305.

Weaver, J. *et al.* (1988) Production of recombinant human CSF-1 in an inducible mammalian expression system. *Bio/Technology* **6**, 287-290.

Wiedermann, F. *et al.* (2001) Recombinant granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in infectious diseases: still a debate. *Wien. Klin. Wochenschr.* **113** (3-4), 90-96.

(李霆　译　　袁静　校)

第9章

用于分析的蛋白质

9.1 引　言

酶和抗体在分析技术中应用范围很广，尤其在体外临床诊断方面更为突出。对于正常和非正常代谢认识的不断深入，使得临床医生能够把各种生物分子浓度的变化与疾病状态或即将发生的疾病联系起来。能够检测和定量多种标志分子的灵敏而又特异的诊断分析方法，现在得到了广泛应用，这些诊断系统在很大程度上帮助了医疗工作者作出准确的诊断或对医学异常现象作出预判，这样就能使他们制定最适合的治疗方案。

临床化学是一门学科，负责对生物样品中存在的多种标志物质进行检测、监控和定量。在很广范围内的生物分子都有很有意义的潜在诊断价值，这些物质包括低分子量的代谢产物，例如尿素、葡萄糖、胆固醇或甾体类激素。很多高分子量的物质，例如由损坏组织释放的特异蛋白质或由于特定代谢紊乱导致的某种蛋白质浓度的变化，也具有诊断价值（表 9.1）。其他一些诊断检测方法包括病毒或微生物大分子组装的方法也已发展起来了。

很重要且需要指出的一点是，在自然条件下，大部分疾病状态是动态的而不是静止的。很多诊断结果的价值通常不仅与检测的敏感性和特异性紧密相关，而且也与获得结果的速度相关。实际上，很多疾病状态的发展通常是通过在适当的时间间隔从病人采取标本做重复试验来监控的。

很多诊断系统现已被设计成自动化操作。在临床实验室中使用自动的多样品分析仪增加了诊断分析的速度、效率、生产量以及经济效益。通常血和尿是分析中最常使用的生物样品，尽管其他人体产物，例如粪便、唾液或汗液也会用到。

出于诊断目的而作为分析工具的蛋白质包括多种酶和抗体。酶主要用于检测和定量生物样品中的多种医学上有意义的代谢物。抗体通常用于检测和定量样品中的特异抗原。反之，抗原可用于检测血清中存在的特异抗体。使用与艾滋病病毒（HIV）相关的特异抗原来检测血或血清中抗 HIV 抗体的存在就是利用后一种方法（后文详述）。

表 9.1　一些具有诊断意义的蛋白质和与这些蛋白质浓度升高或降低潜在相关的疾病

蛋　白　质	与蛋白质浓度升高相关的疾病	与蛋白质浓度降低相关的疾病
白蛋白	血脑屏障损伤	营养不良；肝硬化；严重烧伤；炎症；肾病
α_1酸糖蛋白	发炎；恶性增生	重症肝损伤；肾病综合征
α_1抗胰蛋白酶	急性肝病；活动性肝硬化；炎性疾病	遗传缺陷；慢性肺病
α_2巨球蛋白	肾病综合征；口服避孕药；糖尿病	弥散性血管内凝集；压力
载脂蛋白 A1		动脉硬化症；Tangier 病
载脂蛋白 B	动脉硬化症；高脂血症	
C 反应蛋白	炎症；肿瘤；组织损伤；活动期风湿性关节炎	
血浆铜蓝蛋白	发炎；口服避孕药	Wilson 病；营养不良
补体 C3	炎性疾病	自身免疫疾病；狼疮；慢性肝炎；新生儿呼吸组织损伤
补体 C4	急性炎性疾病；细菌感染	急性肾小球炎（原著误作 acute glonerular nephrities——译者注）；慢性肝炎；自身免疫疾病；狼疮
结合珠蛋白	发炎	溶血性贫血症；镰刀细胞贫血症；肝病
免疫球蛋白 A	IgA 骨髓瘤；肝硬化；慢性肝病；慢性感染	免疫缺陷；非 IgA 骨髓瘤
免疫球蛋白 G	慢性感染；IgG 骨髓瘤；肝病；多发性硬化症；脑膜炎	免疫缺陷
免疫球蛋白 M	IgM 骨髓瘤；肝病；急性肝炎	免疫缺陷；非 IgM 骨髓瘤
Kappa(轻链)	副蛋白血症；本周轻链疾病	副蛋白血症
Lambda(轻链)	副蛋白血症；本周轻链疾病	副蛋白血症
微白蛋白	早期肾病；糖尿病；高血压	
前白蛋白		营养不良；肝病；急性发炎
备解素因子 B		自身免疫疾病；镰刀细胞疾病；细菌疾病
类风湿因子	类风湿关节炎；混合性连接组织疾病；病毒和细菌性紊乱	
转铁蛋白	铁缺乏；怀孕；急性肝炎；口服避孕药	发炎

多种其他可供选择的技术也形成了大量诊断测试的基础。一些技术包括电泳、传统的层析、高效液相色谱（HPLC）、等电聚焦及色谱聚焦，都应用于常规现代临床化学实验室。最近，基于重组 DNA 技术的各种诊断技术也进入临床领域，它可以检测标志性的遗传异常，例如一些遗传紊乱的存在，如杜兴（Duchenne）肌肉萎缩症或囊性纤维化。DNA 检测的特点是高度的特异性、敏感性和快速。这些检测方法的产生对实验室医学的未来发展会产生深远的影响。

尽管大部分酶和抗体的分析应用与临床诊断相关，但也可用于检测和定量其他方面的重要分析物（例如食品工业和环境监控），在这些方面的应用在这章中也会进行简略地讨论。

9.2　用于诊断/分析试剂的酶

多种酶制品已用于诊断试剂多年了，酶可以用来检测和评估生物样品中存在的特异分析物的水平。在特定情况下，酶可用于催化除去样品中对特定代谢物分析有干扰的多种物质。酶在酶免疫分析（enzymeimmunoassay，EIA）系统中也被广泛地用作标记物。高度的选择性以及催化效率使许多酶制品成为理想的诊断试剂。

目前 70 多种用于分析目的的酶是由商业公司制造的，例如 Boehringer Mannheim 诊断试剂（已经与 Roche 诊断试剂合并）和 Genzyme。其他公司从这些公司大批量地购买酶用

于生产终端分析试剂盒。全世界分析酶的市场已经超过 1 亿美元，而且还在持续增长。碱性磷酸酶和过氧化物酶是产量最大的两个诊断用酶，每一个的市场价值都超过 2000 万美元。多种标准决定了一个酶是否适合用于分析，这些标准包括以下几项。

① 催化反应的特异性。对于要测量的分析物酶必须显示高度的底物特异性。如果要分析的样品中潜在着对其他物质的副反应，而且该副反应能干扰诊断系统，那么这种副反应就必须被消除。

② 动力学特征。酶应该具有合适的 K_m 和 K_{cat} 值，不被待分析样品中可能或潜在的物质所抑制。

③ 资源有效性及费用。酶应该能通过天然或重组的方式大批量制造。上游及下游的处理费用有竞争力。

④ pH 和温度与活性范围的关系，在分析状态下，应该具有显著的催化活性。

⑤ 酶的稳定性：在特定的储存条件下酶应该能稳定几个月，在进行分析的状态下也应该保持稳定。

用于分析目的的酶来自于多种植物、动物、微生物（表 9.2）。尽管一些酶（碱性磷酸酶和胆固醇氧化酶）现在能通过重组 DNA 技术大量生产，但是多数仍通过自然来源直接提取生产。尽管大量的分析用酶能够在重组大肠杆菌中与多种真菌系统中表达，但是用于商业生产的重组系统一般包括链霉菌和毕赤酵母菌。

多数用于分析目的的商业用酶年需求量为 1～10kg，少数酶（例如葡萄糖氧化酶）能

表 9.2　直接或间接作为诊断试剂的酶以及它们的来源和应用

酶	来　源	应　用
乙酰胆碱酯酶	牛红细胞	分析有机磷化合物，例如杀虫剂
乙醇脱氢酶	酵母	测定生物液体中的乙醇水平
碱性磷酸酶	牛小肠和肾；重组毕赤酵母菌	与抗体耦联，作为酶联免疫吸附分析（ELISA）系统的指示剂
精氨酸酶	牛肝	测定血浆和尿液中的 L-精氨酸的水平
抗坏血酸氧化酶	葫芦科	测定抗坏血酸水平；排除抗坏血酸干扰
胆固醇酯酶	猪/牛胰腺；假单胞菌；重组（链霉菌）	测定血清胆固醇水平
肌胺酸激酶	兔肌肉；牛心脏；猪心脏	诊断心脏和骨骼功能障碍
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	酵母；*Leuconostoc mesenteroids*（明串珠菌属）	与己糖激酶联用测定葡萄糖和 ATP
葡萄糖氧化酶	黑曲霉	与过氧化物酶联合测定生物样品中的葡萄糖；作为 ELISA 系统的指示剂
谷氨酸脱氢酶	牛肝	与尿素酶联用测定血中尿素氮的含量
甘油激酶	*Candida mycoderma*（念球菌属）；*Arthrobacter* sp.（节杆菌属）	与脂肪酶联用测定血中的甘油三酯水平
甘油-3-磷酸脱氢酶	兔肌肉	测定血清甘油三酯
己糖激酶	酵母	测定体液中的葡萄糖
过氧化物酶	辣根	在产生过氧化物的反应中作为指示酶
磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶	大麦叶	测定体液中的 CO_2
脲酶	刀豆	测定血中尿素氮；ELISA 系统的标志酶
尿酸酶	猪肝	测定尿酸
黄嘌呤氧化酶	脱脂乳	测定生物液体中黄嘌呤和次黄嘌呤

以更高的水平生产（每年 100kg 或更高）。多数用于诊断目的的酶制品已经过某种形式的纯化。不像用于肠胃外投药的蛋白制品，诊断试剂不必纯化得很均一，但是，非常关键的是要保证使用的纯化程序能除去初制品中可能干扰分析或导致错误结果的蛋白质或其他分子。

在检测具有诊断意义的多种分子中使用的大部分酶制品是以可溶状态存在的，但是，在一些应用中，酶也以固定化的方式被利用，这种形式的实例将在后面详述。

9.2.1　终点法与动力学方法的比较

用于检测和定量特异分析物使用的酶通常使用可能的分析物作为底物。一旦共反应物的一个或另一个浓度发生变化，辅助因子或反应产物必须被随时监控，事实上经常通过分光光度测定法、荧光测定法或电化学测量法（在许多生物传感器中）来达到目的。当产生信号的大小与存在分析物的浓度成比例时，即可发展定量测试。例如在分光光度测试中，吸收光的量通过比耳（Beer）法则与底物浓度联系在一起（$A=\varepsilon cl$，A=吸收测量值，ε=摩尔吸收系数，c=分析物浓度，l=路径长度）。以酶为基础的分析物定量是以终点法或动力学方法来进行的。

如果一个具有合适特征（例如底物特异性和动力学特征）的酶被确认了，终点法就有可能被开发。本质上酶必须能以化学计量的方式有选择性地、快速并且完全地将目标分析物转化为产物。在这些例子中，预先定量的酶与测试溶液在适合的状态（温度和 pH）下共孵育，接下来定量测定产生的信号（在分光光度测试中为吸收值的改变，图 9.1）。如果反应显示了并不是最有利的平衡常数，酶并不能使分析物完全转化为产物。只要分析是在“推着”或“拉着”反应完成的状态下进行的，基于分析物定量的终点法就仍然是有可能的。事实上可以通过这些方法增加共反应底物的起始浓度（如果存在的话），或添加与反应产物之一反应的物质（去诱捕它）来实现（图 9.2）。

另外一种以酶为基础的检测和定量特异分析物的可供选择的方法命名为动力学方法。基本的酶动力学阐明了对于任何反应，如果现存的底物浓度远低于酶的米氏常数（即 $[S] \ll K_m$），那么观察到的反应速率与底物浓度成线性比例关系。因此动力学方法测量底物被转换的速率（$-dS/dt$）或产物形成的速率（$+dP/dt$）。这个方法要求构建计算曲线，其中要利用已知的底物浓度的变化（图 9.3）。没有变化的以动力学为基础的分析过程进行起来总是远快于终点法，但是通常必须使用相对于分析物有较高 K_m 值的酶。

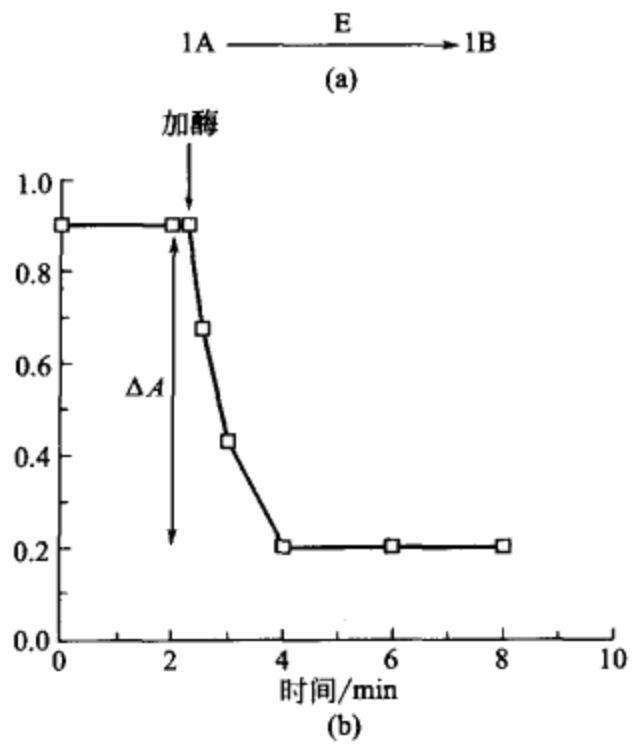


图 9.1　通过酶的终点法检测和定量特定分析物 A

(a) 当在适合的分析状态下孵育时，酶能以化学计量的方式完全或事实上完全将 A 转化为 B。在这种情况下，一个分子的 A 转化为一个分子的 B；(b) 消耗底物的量或形成产物的量可被定量。在这种情况下，A 吸收（在选定的波长下）然而 B 并不吸收，通过比耳法则，记录的吸收值变化可直接与分析物浓度相关联

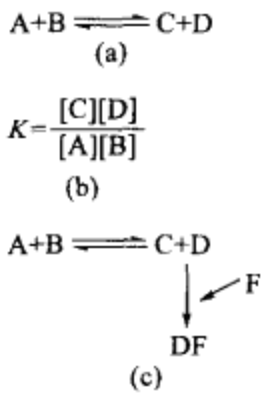


图 9.2　酶将 A+B 转换为 C+D 的总反应

反应的平衡常数 K 值是根据（b）中的公式计算的。当达到平衡时，几乎完全将 A+B 转换为 C+D 的反应会显示较高的 K 值。如果反应没有接近完全，可通过添加与产物之一（C 或 D）起反应的化学物质，本质上会将反应拉向完全。这个物质在（c）中由 F 代表。在这个例子中，D 几乎一形成就被除去，因此它的浓度持续保持在较低的水平

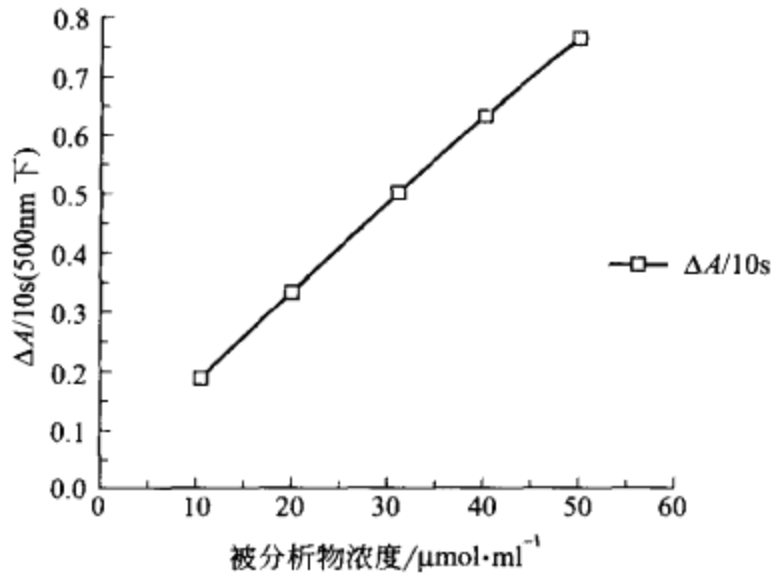


图 9.3　反应速率与分析物（即底物）浓度的典型关系曲线

在图示情况下，分析物在 500nm 有吸收，然而反应产物并不吸收。分析含有未知浓度分析物的样品会产生一个 $\Delta A/10s$ 值，通过参考标准曲线，该值能够与分析物浓度联系起来

9.2.2　一些以酶为基础的普通诊断检测

在诊断系统中应用最普遍的两种酶形式是脱氢酶和氧化酶。在脱氢酶中，反应的进行是通过控制还原型的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinemide adenine dinucleotide，NADH）到 NAD^+ 的转换或反之来追踪的，像下面所说明的一样（S=反应底物；P=反应产物）

$$S+NAD^+ \xrightarrow{\text{脱氢酶}} P+NADH+H^+$$

因为 NADH 在 340nm 有强吸收，所以辅助因子的氧化或还原可随时通过分光光度法来监控，而 NAD^+ 在这个波长并没有吸收。反应的进行也可以通过荧光或发光来追踪。从上面总结的例子来看，很清楚对于存在一个分子的底物（S）就会形成一个分子的 NADH——分析物的浓度能够被测量。因此，在这样一个系统中，形成的 NADH 总量就反映了待分析样品中存在的底物量。

当思考这个例子的时候，很明显所有的分析试剂都应该是过量存在的，以致于是底物的浓度决定了形成的 NADH 最终的量。例如存在不够量的 NAD^+，尽管大量的底物 S 仍然存在，一旦所有的辅助因子转化为 NADH，反应就会终止。在这种情况下，待分析样品中存在的底物量可能会被低估。

催化产生过氧化氢作为反应产物的过氧化物酶在诊断系统中使用得也很普遍。但是在大多数情况下，这个初级反应的终产物（例如 P 或下面例子中的 H_2O_2）并不会被随时定量，因此在分析系统中包含另外一个酶促步骤。第二个“连接子（linker）”酶利用起始酶催化步骤的产物之一作为它的底物之一，在下面的例子中是 H_2O_2。不像初级酶催化步骤，第二个

反应的一个或另一个产物使用适合的分析方法很容易被测量。在引用的例子中，第二个酶利用初级反应中产生的 H_2O_2，以及另一个无色物质作为底物，产生水和有颜色的染料作为产物。产生染料的量可通过控制在适合波长下吸收值的增长来测量。只要反应系统中存在的所有反应物质过量，通过耦联分析产生的染料量就与待分析样品中存在的底物量直接相关。

在上面讨论的例子中归纳出的概念，在下面讨论的特定例子中得到很清楚的证明。其他几种酶促方法也已发展起来了，用于分析多种具有诊断目的的生物物质。

$$S+1/2O_2+H_2O \xrightarrow{\text{氧化酶}} P+H_2O_2$$

$$H_2O_2+\text{无色底物} \xrightarrow[\text{例如过氧化物酶}]{\text{第二种酶}} \text{染料(有色)}+H_2O$$

9.2.3　血糖分析

血中存在的葡萄糖浓度对于几种疾病状态来说是很重要的诊断标志，尤其是糖尿病。血糖测量是临床化学实验室中进行得最为普遍的分析项目之一。大部分这样的测量是基于几种有用的特定分析。利用葡萄糖氧化酶的系统是发展得最早的以酶为基础的测试方法之一，反应原理如下：

$$\text{葡萄糖}+O_2+H_2O \xrightarrow{\text{葡萄糖氧化酶}} \text{葡萄糖酸}+H_2O_2$$

$$2H_2O_2+\text{4-氨基安替比林}+\text{苯酚} \xrightarrow{\text{过氧化物酶}} \text{醌亚胺}+4H_2O$$

在这个耦联分析中，起始样品中的葡萄糖水平与形成的醌亚胺数量直接相关。不像其他反应产物，醌亚胺是一种红-紫色的染料，其浓度可通过检测其在 500nm 波长下的吸收来测量。

在上面的例子中，分析系统中存在的反应由葡萄糖氧化酶、过氧化物酶，还有苯酚和4-氨基二甲基苯基吡唑酮组成，特定体积的这种反应混合物与特定体积待分析的血清样品共孵育，反应在适合的时间段内进行，典型的为 5～10min，还有适合的温度，一般为 20～37℃，直到血清样品中存在的所有葡萄糖都被酶催化转化为葡萄糖酸。血清样品被标准葡萄糖溶液替换的附加分析通常也同时进行。血清样品中的葡萄糖浓度可通过其与标准吸收曲线的比较来计算。

另外一个经常用来测量血糖水平的分析系统是利用己糖激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6P-DH)，反应原理概括如下：

$$\text{葡萄糖}+ATP \xrightarrow{\text{己糖激酶}} \text{葡萄糖-6-磷酸}+ADP$$

$$\text{葡萄糖-6-磷酸}+NAD^+ \xrightarrow{\text{G6P-DH}} \text{葡萄糖酸盐-6-磷酸}+NADH+H^+$$

样品中存在的葡萄糖浓度与由耦联分析形成的 NADH 量相关联，可以很容易地通过测量在 340nm 处的最终吸收来监控。

上面的分析系统能够快速、准确、方便地测量任何待测样品中的血糖浓度。但是，这样的结果仅仅反映采血样时的葡萄糖浓度。

监控长期的平均血糖水平的诊断测试也很有用。这些测试总是以评估血清样品中存在的糖基化血红蛋白水平为基础。升高的血糖浓度通过把葡萄糖残基共价连接到血红蛋白 β 链的末端缬氨酸上来促进血红蛋白分子的糖基化。该反应在红细胞 120d 的生命周期中呈进行性

发生，因此血样中糖基化的血红蛋白水平反映了几个星期的血糖水平。这种分析手段在评估治疗方法应用到糖尿病人身上的长期效果方面，具有无法估量的价值。从天然血红蛋白中分离糖基化的血红蛋白，通常可利用电泳或色谱法来实现。

9.2.4 血中胆固醇和甘油三酯的分析

动脉硬化症与升高的血浆胆固醇水平之间的关系已被确定，这个关系尤其与低密度脂蛋白相关的胆固醇（LDL-胆固醇）水平相关联。在西方社会每两个动脉硬化症患者中有一人死亡。

由于主要呈疏水性质，胆固醇和甘油三酯以称为脂蛋白的可溶性复合物形式在血流中运送（图 9.4）。脂蛋白颗粒的外层主要由磷酸脂质和称为载脂蛋白的蛋白组成，分子的亲水部分指向周围的水环境，脂蛋白的内部主要由甘油三酯和与长链脂肪酸通过酯键共价相连的胆固醇、胆固醇酯所组成。

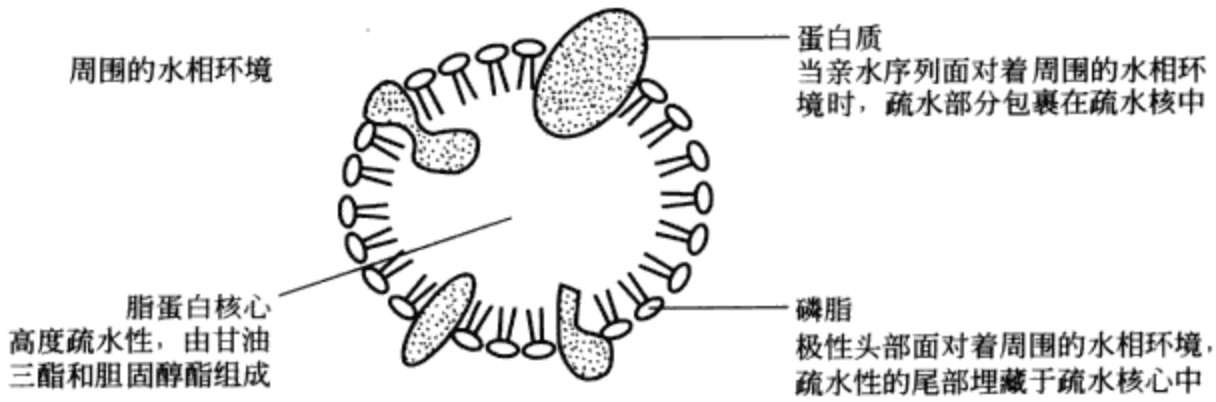


图 9.4 血浆脂蛋白的结构示意

基于物理化学性质的不同，脂蛋白可被分为高密度脂蛋白（high density lipoproteins，HDL）、低密度脂蛋白（low density lipoproteins，LDL）和极低密度脂蛋白（very low density lipoproteins，VLDL）（表 9.3）。乳糜微滴是在血浆中发现的另外一群脂蛋白，尤其是在进食富含脂类食物之后，乳糜微滴是最大的脂蛋白，几乎全部由甘油三酯组成。它们负责运送食物中的脂肪。

表 9.3 在各种脂蛋白中甘油三酯和胆固醇的大约含量

项　目	甘油三酯/%	胆固醇/%
乳糜微滴	85～90	2～4
VLDL	50～60	15
LDL	10	45
HDL	3～4	17～18

循环中 LDL-胆固醇的特异增长与动脉硬化症的发展相关，另一方面，HDL-胆固醇的水平升高显示出对具有动脉硬化症特征的动脉内壁脂肪贮存的发展有保护效应。这是由于 HDL 具有将胆固醇从外周组织运送回肝脏的功能，在那儿胆固醇可被转化为胆汁盐。

目前有几种诊断方法能够测量血清胆固醇浓度。总血清中的胆固醇水平可用下面阐述的三步耦联酶催化系统来估计。

$$\text{胆固醇酯}+H_2O \xrightarrow{\text{胆固醇酯酶}} \text{胆固醇}+\text{脂肪酸}$$

$$\text{胆固醇}+O_2 \xrightarrow{\text{胆固醇氧化酶}} \text{4-胆甾烯酮}+H_2O_2$$

$$2H_2O_2+\text{苯酚}+\text{4-氨基安替比林} \xrightarrow{\text{过氧化物酶}} \text{醌亚胺}+4H_2O$$

在起始反应中，胆固醇酯酶催化胆固醇酯的水解，产生游离的胆固醇，胆固醇然后被胆固醇氧化酶氧化。产生的 H_2O_2 可通过过氧化物酶系统来定量。终产物醌亚胺是一种红色染料，可以很容易地通过测量它在 500nm 处的吸收来定量。

总血清 HDL-胆固醇也可使用上面的分析方法来特异性地定量。在这种情况下，首先从血清样品中除去其他脂蛋白是很必要的，可以通过添加磷钨酸和镁离子来实现，它们能够促进 LDL、VLDL 和乳糜微滴的沉淀。离心之后，含有 HDL 的上清的胆固醇含量就可通过上面的步骤来分析。

血清甘油三酯的水平升高与动脉硬化症和冠状动脉病相关。已经开发了很方便评价血清中甘油三酯浓度的各种酶促系统。普遍使用的一个系统是基于 4 个连续的酶促反应，说明如下：

$$\text{甘油三酯}+H_2O \xrightarrow{\text{脂肪酶}} \text{甘油}+\text{脂肪酸}$$

$$\text{甘油}+\text{ATP} \xrightarrow{\text{甘油激酶}} \text{甘油-3-磷酸}+\text{ADP}$$

$$\text{甘油-3-磷酸}+O_2 \xrightarrow{\text{甘油-3-磷酸氧化酶}} \text{磷酸二羟丙酮}+H_2O_2$$

$$H_2O_2+\text{4-氨基安替比林}+\text{氯酚} \xrightarrow{\text{过氧化物酶}} \text{醌亚胺染料}+HCl+2H_2O$$

血清样品中甘油三酯的浓度很明显与产生的染料的数量成比例。醌亚胺的水平可以通过检测它在 500nm 处的吸收值来测量。

多种其他酶促系统也已经得到开发，用以定量生物样品中的甘油三酯水平，如下所示：

$$\text{甘油三酯}+H_2O \xrightarrow{\text{脂肪酶}} \text{甘油}+\text{脂肪酸}$$

$$\text{甘油}+\text{ATP} \xrightarrow{\text{甘油激酶}} \text{甘油-3-磷酸}+\text{ADP}$$

$$\text{ADP}+\text{磷酸烯醇式丙酮酸} \xrightarrow{\text{丙酮酸激酶}} \text{ATP}+\text{丙酮酸}$$

$$\text{丙酮酸}+\text{NADH}+H^+ \xrightarrow{\text{乳酸脱氢酶}} \text{乳酸}+NAD^+$$

9.2.5　血中尿素和尿酸的分析

在大多数临床实验室中，进行尿素和尿酸的测量都很频繁。这些代谢物水平的上升经常是各种代谢紊乱的指征，包括肾病。评估尿素水平的大部分方法中涉及尿素酶，它能够像下面所示的那样催化尿素的水解：

$$\text{尿素}+H_2O \xrightarrow{\text{尿素酶}} \text{氨}+CO_2$$

多种方法可用于检测和定量该反应中形成的氨的数量。一种方法是基于形成氨的化学检测，在硝普钠存在下，铵离子与苯酚和次氯酸盐反应，形成蓝色的化合物，其在 640nm 处有强吸收。

另一种用来定量产生氨的酶促方法是利用谷氨酸脱氢酶，如下所示：

$$\text{尿素}+H_2O \xrightarrow{\text{尿素酶}} 2NH_4^+ +CO_2$$

$$2\alpha\text{-酮戊二酸}+2\text{NADH}+2NH_4^+ \xrightarrow{\text{谷氨酸脱氢酶}} 2\text{ 谷氨酸}+2\ NAD^+ +2H_2O$$

第二个反应中形成的 NAD^+ 可随时被监控，当然它与起始样品中存在的尿素数量成比例。

尿酸也可通过多种酶促系统被定量。更普遍的方法之一是利用由尿酸酶和过氧化物酶组成的耦联分析系统，如下所示。终产物红染料醌亚胺在 520nm 处有最大吸收。

$$\text{尿酸}+O_2+2H_2O \xrightarrow{\text{尿酸酶}} \text{尿囊素}+CO_2+H_2O_2$$

$$2H_2O_2+\text{4-氨基安替比林}+\text{3,5-二氯-2-羟基苯甲磺酸} \xrightarrow{\text{过氧化物酶}} \text{醌亚胺}+4H_2O$$

另一种定量尿酸的方法如下：

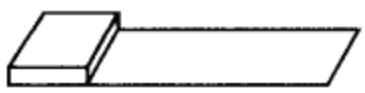
$$\text{尿酸}+O_2+2H_2O \xrightarrow{\text{尿酸酶}} \text{尿囊素}+CO_2+H_2O_2$$

$$H_2O_2+\text{乙醇} \xrightarrow{\text{过氧化氢酶}} \text{乙醛}+2H_2O$$

$$\text{乙醛}+NADP^+ \xrightarrow{\text{醛脱氢酶}} \text{乙酸}+NADPH+H^+$$

NADPH 形成在 340nm 处增加的吸收与样品中存在的尿酸数量成比例。

9.2.6 作为诊断试剂的固定化酶



(a)

$$\text{葡萄糖}+O_2+H_2O \xrightarrow{\text{葡萄糖氧化酶}} \text{葡萄糖酸}+H_2O_2$$

$$H_2O_2+\text{染料(还原型)} \xrightarrow{\text{过氧化物酶}} H_2O+\text{染料(氧化型)}$$

(b)

图 9.5 使用测验片量尺检测生物（或其他）液体中的葡萄糖

(a) 这个装置由一个薄塑料条组成，在一端附有一块可吸收的小垫；(b) 当葡萄糖存在时固定在小垫上的酶能产生有颜色的产物。葡萄糖氧化酶、过氧化物酶和一种在氧化后能改变颜色或产生颜色的染料所组成的混合物应用得最为普遍

以固定化形式发展和使用诊断试剂已有稳步增长。在临床实验室中可直接根据医生或事实上病人自己选定的诊断目的，来利用固定在试剂条上的酶。

最为普遍应用的试剂条之一是那些设计用来检测体液中葡萄糖的。胶片厚的塑料条的一端含有一个狭窄的小垫，样品可以加在上面。样品扩散到整个小垫，小垫上除了要求的辅助试剂外，还含有适合的诊断酶。

设计大多数这样的系统，要保证最终酶促反应产生的产物之一是色原体，就是有颜色的。因此，在加入样品之后，大部分系统是基于小垫上颜色形成的视觉观察（图 9.5）。产生颜色的强度反映了所加样品中代谢物的浓度，因此，这样的试剂盒能以半定量的方式应用。

9.3 生物传感器

生物传感器是一类检测和定量复杂样品中特异分析物的分析装置。它们由以下部分所组成：以定量方式有选择地与目标分析物结合的生物成分；把生物信号定量地转换为物理或化学信号的传感器；把传导信号的数字式的读出方式传到终端使用者的检测器（图 9.6）。

对于目标分析物，生物成分必须明显地显示出极高的特异性，与分析物的结合必须产生一种能够被传导（转换）为物理或化学信号的可检测到的反应。对于大多数传感器，生物成分是一种酶。尽管其他的光学、质量和热量测试系统也发展起来了，但大部分生物传感器使用基于电化学的系统作为信号传感器。作为分析物检测或定量系统，传感器展示了许多优

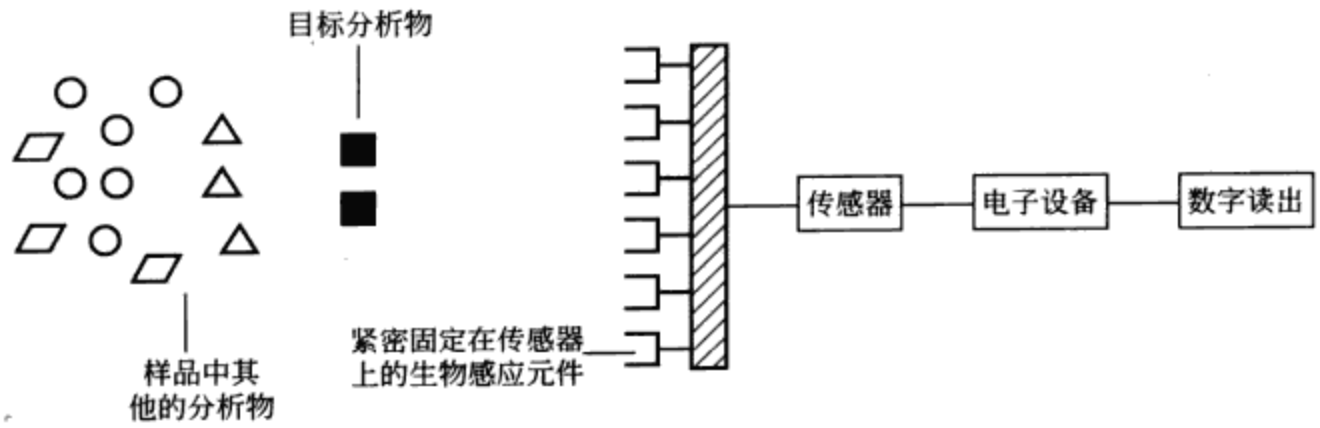


图 9.6　生物传感器的示意图

详见正文

点，包括：

① 可重复利用性，最实惠的经费问题。

② 不需要其他试剂去完成测量。

③ 分析样品不需要预先处理，例如除去有颜色的成分或颗粒物质。

④ 灵活性；在某些领域可使用手提生物传感器，当需要时，生物传感器可用于处理单个或多个样品（在一个多用分析仪上处理单个分析样品是不经济的/不现实的）。

⑤ 使用方便；生物传感器并不复杂，通常能由没有经过技术培训的人员使用。

尽管一些生物传感器用于食品分析（表 9.4），大部分到目前为止还是应用于诊断/临床方面（表 9.5）。

表 9.4　食品工业中重要的并且可用生物传感器测定的分析物（尽管并不是全都商业化）

分　析　物	酶
葡萄糖	葡萄糖氧化酶
果糖	果糖脱氢酶
蔗糖	蔗糖酶和葡萄糖氧化酶
乳糖	β-半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶
乳酸	乳酸氧化酶和乳酸脱氢酶
抗坏血酸	抗坏血酸氧化酶
柠檬酸	柠檬酸裂解酶和草酰乙酸脱羧酶
乙醇	甲醇氧化酶和甲醇脱氢酶
天冬氨酰苯丙氨酸甲酯	APBC，天冬氨酸氨基转移酶和谷氨酸氧化酶
亚硫酸盐	亚硫酸氧化酶

注：大多数情况下，单一酶的生物传感器就足够了。但是在一些情况下，要求两种或更多种酶混合起来去产生容易检测的反应产物。例如蔗糖酶水解二糖，产生葡萄糖和果糖，然后葡萄糖氧化酶通过氧化葡萄糖产生可测量的电化学信号。在天冬氨酰苯丙氨酸甲酯的例子中，天冬氨酸肽键裂解酶（aspartate peptide bond cleaving enzyme，APBC）裂解这个二肽的肽键，产生游离的天冬氨酸和苯丙氨酸甲酯，然后天冬氨酸氨基转移酶把天冬氨酸转化为谷氨酸，接下来谷氨酸氧化酶产生电化学信号。

表 9.5　诊断中重要的并且可用特殊定量酶电极测量的分析物以及在这些测试系统中用到的酶

分　析　物	在检测中用到的酶
葡萄糖	葡萄糖氧化酶
尿素	尿素酶
尿酸	尿酸酶
氨基酸	L-氨基酸氧化酶
胆固醇	胆固醇氧化酶
甲醇	甲醇氧化酶
青霉素	青霉素酶

9.3.1 以酶为基础的生物传感器

多种固定化酶已用于建造以酶为基础的生物传感器。这些生物传感器通常利用基于电化学的检测系统。设计和建造一个酶传感器所采用的原理很简单（图 9.7）。固定化酶通常包裹在一个膜结构中，膜包围着选定的电极。对于固定化酶反应，面对着检测样品周围水相环境的外膜的孔径尺寸要求足够大以允许所有必需底物的自由穿透。很明显这些底物之一就是目标分析物。为了保护固定化酶，外膜通常由聚碳酸酯构成，必须阻挡蛋白质颗粒物质和整个细胞的进入。内膜位于固定化酶和电极表面之间，必须不能干扰反应底物和产物的扩散。这些分子必须自由地与电极表面进行接触。内膜通常是由醋酸纤维素构成的。

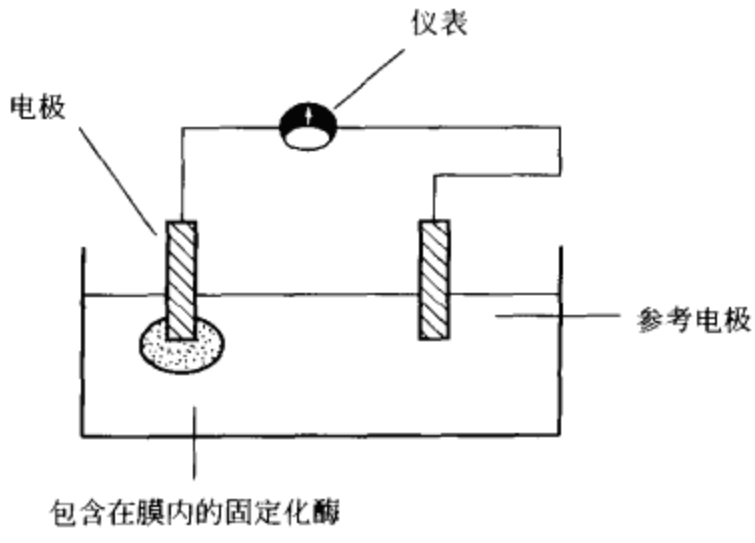


图 9.7 酶电极的图示

尽管大多数生物传感器利用以膜为基础的酶滞留系统，酶滞留的其他形式也可利用（参见第 10 章酶固定化部分）。例如酶被滞留在以聚丙烯酰胺或明胶构成的凝胶内。另一种可供选择的方法是酶共价连接于与检测电极很接近的支持材料上，或直接连到电极本身上。酶的共价连接使生物传感器有最长的使用寿命。

在建造酶电极时有几种电极方式可以使用。各种特异检测气体（如 O_2、CO_2、NH_3）和离子类的电极在市场上均有销售。选择电极依赖于酶促反应产生什么产物。例如如果产生了氧气，那么就使用氧气电极。撞击在电极表面的氧分子的数量被转换为某种形式的可检测信号，例如一股电流，然后这个信号能被监控。当电极浸在已知浓度的分析物的溶液中时，所获得的读数可以建立标准曲线。

在建造酶电极时，通常选择的酶利用可被追踪浓度的分析物作为底物，其他底物或反应产物的一种或另一种可由实际的电极来检测和定量。

当酶电极浸入到测试样品中时，浓度可被追踪的分析物扩散到外膜，与固定化酶相接触，因此催化转化。然后反应产物传递到内膜，撞击到电极表面，这样产生信号。信号的强度与测试样品中存在的底物浓度成比例。

上面所述的第一代酶生物传感器有许多缺陷，包括由于分析样品中存在干扰离子，产生的高背景值。在这些生物传感器系统中加入电子转移介质大大克服了这些困难。一些介质是低分子量物质，例如醌和二茂铁，它们促进在电极和使用的（氧化还原型）酶之间的电子转移。介质在较低的氧化还原电势上起作用，允许操作系统在较低的电极电势上运行。在这种情况下，电极仅仅检测来自于介质的转移，它与样品中存在的目标分析物的浓度直接成比例。

对于大多数酶电极来说，目标分析物是所用酶的（共）底物。最近取得的一个进步是抑制酶电极。在这种情形下选择酶的依据是它被目标分析物所抑制。样品中分析物的存在导致了酶活力的减少，酶活力可由电化学（或其他）检测系统定量测量。例如多种杀虫剂可通过它们抑制固定化的乙酰胆碱酯酶来检测。

9.3.2　不以酶为基础的生物传感器

利用除了酶以外的生物物质的一套传感器也已发明出来。可供选择的生物成分包括（非催化性的）蛋白质、DNA 和全细胞。蛋白质例如谷胱甘肽-S-转移酶已被改造得可以选择性地与特异重金属结合。这个改造过的蛋白质直接被固定在作为信号传导器的金质电极上，重金属结合到改造蛋白质上导致蛋白质构象的变化，然后以与目标金属浓度成比例的方式改变系统的电容量。

基于抗体的生物传感器也已发明了。这个方法明显的长处在于抗体能够由大部分目的抗原产生。可以预见的是，主要的技术障碍是发展能够检测抗原-抗体结合的适合的传导系统。原子力显微镜的方法也许可以用于监控生物特异性的分子之间的相互作用，例如抗体-抗原的结合。但是仅仅费用方面的考虑就使得这种方法的商业探索不太可能。光学技术，例如表面等离子体激光共振也能直接检测发生在表面-溶液交界处的抗体-抗原相互反应（图 9.8），基于这种方法的一些系统也已发明了。在发展以 DNA 为基础的生物传感器中所追寻的总的策略伴随着单链 DNA 序列的固定。与互补性的目标敏感序列的杂交能够与产生适合的光学或电学信号的系统相连接。这些生物传感器在临床、环境和法医学方面显示了明显的潜力。利用全细胞的生物传感器也已发明了，在一些情况下已商业化。使用的细胞总是微生物的，在体外环境中它比植物或动物细胞更结实。细胞通常滞留在装配得与电极很近的凝胶或膜内。最初商业化的这样的系统之一是用于检测环境样品的生物需氧量（biological oxygen demand，BOD）的生物传感器。样品中存在的有机污染物质可由固定化的皮肤毛孢子菌（*Trichosporon cutaneum*）的微生物细胞来代谢。与细胞呼吸相关的增长导致溶解氧的消耗增长，这可通过氧电极来定量检测。

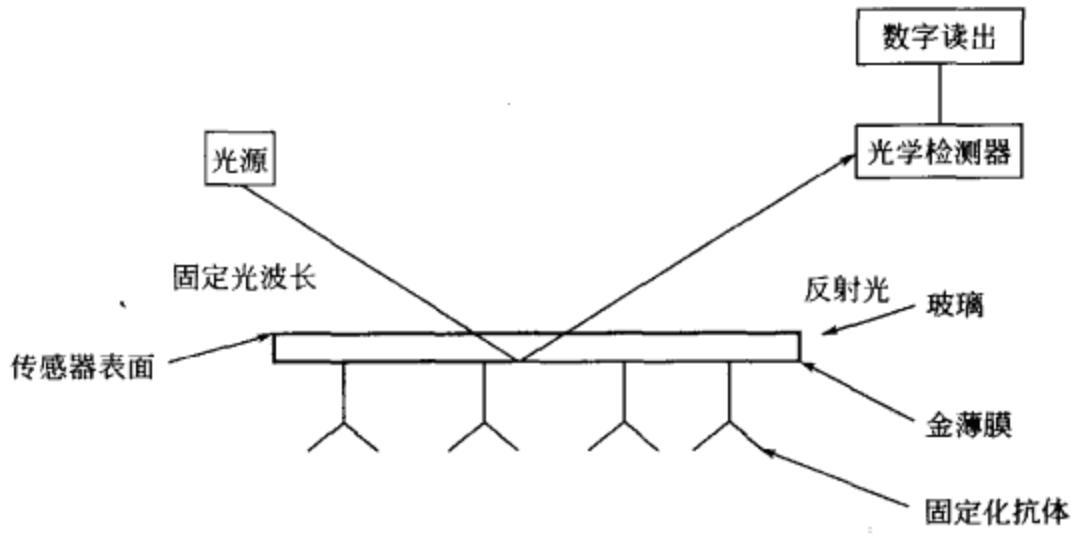


图 9.8　由表面等离子体激光共振（surface plasmon resonance，SPR）检测抗体-抗原的结合简图

如图所示固定波长的光波直射到薄金属薄膜上（并由此反射），结合到金属表面的目标分析物（通过固定化抗体）轻微改变了表层的折射指数，造成了反射光密度的减弱，这可通过适合的检测器定量测量

9.4 作为分析试剂的抗体

抗体是经常用作诊断试剂的另一群蛋白质。抗体作为分析试剂的优点在于识别特异配基（刺激抗体产生的抗原），它们能展示极高的特异性。抗体制品经常用于检测和定量各种特异分析物，其中很多都具有相当大的诊断意义。因此在临床实验室抗体有广泛的分析用途，而且也用于其他方面，包括食品工业和环境监测。要记住物质的免疫活性并不一定与它的生物活性相等，对于蛋白质抗原尤为如此。即使在减少生物活性的状态下，许多蛋白质也能保持免疫特征。在特定情况下，为了检测和定量血清样品中特异抗体种类的存在，抗原分子可用作诊断试剂。

使用抗体检测和定量特异物质的分析过程一般命名为免疫分析。为了诱发针对特定分子产生抗体，目标物质首先用作抗原注射到动物体内。如果抗原太小不能诱发免疫反应，可以与较大的载体分子相连，赋予它抗原活性。在免疫分析系统中单克隆或多克隆抗体制品都可以使用。

抗体分子本身并没有有利于它们在免疫分析系统中进行直接检测的内在特征。因此发展成功的免疫分析方法的另一个重要的步骤是加入适合的标志。这个标志能够促进抗原-抗体结合的快速检测。使用放射性标记作为标记系统的免疫分析系统命名为放射免疫分析（radioimmunoassays，RIA），利用酶的免疫分析系统命名为酶免疫分析（enzyme immunoassays，EIA）。

9.4.1 放射免疫分析

RIA 是最初发明的免疫分析系统之一。这些系统成功地用在以很低浓度存在于体内的多种生物分子的定量上。在基础研究领域和许多应用目的中 RIA 技术应用得很广泛。

最初发展 RIA 系统时需要两种基本试剂：①能够针对目的抗原产生的抗体；②以放射性标签（例如^{125}I）标记的高度纯化的抗原。在所有分析系统中加入抗体的浓度一定是有限的，而放射性标记的抗原浓度一定是过量的。

在典型的放射免疫分析中，适当体积的抗体、标记抗原和用于分析的样品在一起孵育。当抗体浓度是有限的，为与抗体（antibody，Ab）结合，样品中存在的抗原（antigen，Ag）就会与标记抗原（Ag*）竞争：

$$Ag + Ag^* + Ab(\text{有限}) \rightleftharpoons AgAb + Ag^*\,Ab + Ag + Ag^*$$

在所有这些系统中，抗体和使用的标记抗原的量保持不变。当达到平衡时，分析样品中存在的抗原的量越多，被抗体结合的标记抗原的量就越少。

在分析过程中，下一步包括从游离抗原中分离结合抗原。分离通常通过这些技术来完成，沉淀抗原-抗体复合物，而把标记的和未标记的没有结合的抗原留在溶液中。物理分离也可以完成，轻轻地把上清液从分析试管中倒掉，以便于仅留下沉淀。事实上从溶液中沉淀抗原-抗体复合物经常通过向反应混合物中添加另一种抗体来达到。第二个抗体可由第一个结合抗原的抗体所产生。

一旦把游离的与结合的抗原分离开，通常可估计与结合抗原相关的放射性水平。像前文提到的，分析样品中存在的没有标记的抗原越多，结合的标记抗原的比例就越低，因此获得的放射性计数就越低。

抗原浓度与结合的放射性相关联的标准曲线可通过分析几个已知未标记抗原浓度的样品

来建立，这样样品中存在的抗原浓度就可参考标准曲线来计算。

9.4.2　酶免疫分析

成功地引进 RIA 使得过去 30 年来临床和其他生物学的很多领域发生了革命性的变化。但是在这些系统中使用放射性元素也有很多缺点，包括：

① 需要放射保护；

② 产生放射性污染；

③ 由于一些放射性物质只有很短的半衰期，一些分析样品的保质期很短；

④ 需要昂贵的分析设备和进行分析的专门区域。

这些缺点导致了许多使用其他标记的免疫分析系统的发展，一些系统利用荧光和化学发光标签。但是利用酶作为标记物质的免疫分析系统的发展是尤其受人欢迎的。EIA 系统利用：①抗体与刺激它最初产生的抗原结合的极高的特异性与亲和力；②促进信号产生、直接检测和定量的酶的催化效率。概括而言，许多 EIA 展示了与 RIA 相似的敏感性，但是少了大部分与 RIA 相关的缺点。

有时 EIA 被描述为异源或同源系统，异源分析包括结合与游离标签的分离——与标准的 RIA 情况一样。已经发明了一些 EIA，标记酶的活性在很大程度上可被抗体与抗原的结合所改变。在这种情况下，并不要求分离结合的与游离的标签，这样设计的分析系统被命名为同源系统。酶多重免疫分析技术（enzyme multiplied immunoassay technique，EMIT）是同源免疫分析系统已得到广泛商业应用的一个例子（图 9.9）。

EIA 首次在 20 世纪 70 年代初期引进。在大多数系统中，抗体固定在固体表面，即微孔板的孔内壁上（图 9.10）。像经典的 RIA 一样，除了存在于待测样品中未知数量的抗原外，固定抗体与已知数量的标记抗原孵育。当存在的抗体水平有限时，标记和未标记抗原互相竞争与之结合。分析样品中存在的未标记抗原的数量越多，由固定抗体留住的标记抗原就越少。当抗体抗原结合达到平衡时，未结合的抗原就通过清洗步骤除去，剩下的酶标记抗原的量可用来分析酶活力。

EIA 的另一种变化方式包括固定化抗原和使用抗体-酶耦联体。其中的原理概括如图 9.11 所示。固定化抗原同样品中存在的游离抗原互相竞争，与有限量酶标记的抗体结合。分析样品中存在的游离抗原越多，结合在固定抗原上的酶-抗体耦联体就越少。洗涤步骤除去了所有未结合物质，接下来的酶分析可精确估计结合酶的数量。

抗原浓度对结合酶活性的标准曲线可通过分析含有已知量抗原的几个样品来建立。这样未知样品的读数就可参考标准曲线来定量。

9.4.3　酶联免疫吸附分析

自从 30 年以前最初引进至今，基本的免疫分析概念已经发生了很多变化。目前使用最普遍的 EIA 系统之一就是酶联免疫吸附分析（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）。ELISA 系统的基本原理在图 9.12 中进行了说明。这种形式经常是指双抗体夹心技术。

在基本的 ELISA 系统中，由目标抗原产生的抗体被吸附在固体表面——通常是微孔板孔的内壁，然后与被分析的样品在孔内孵育。存在的抗原将会与固定化抗体结合，经过一段

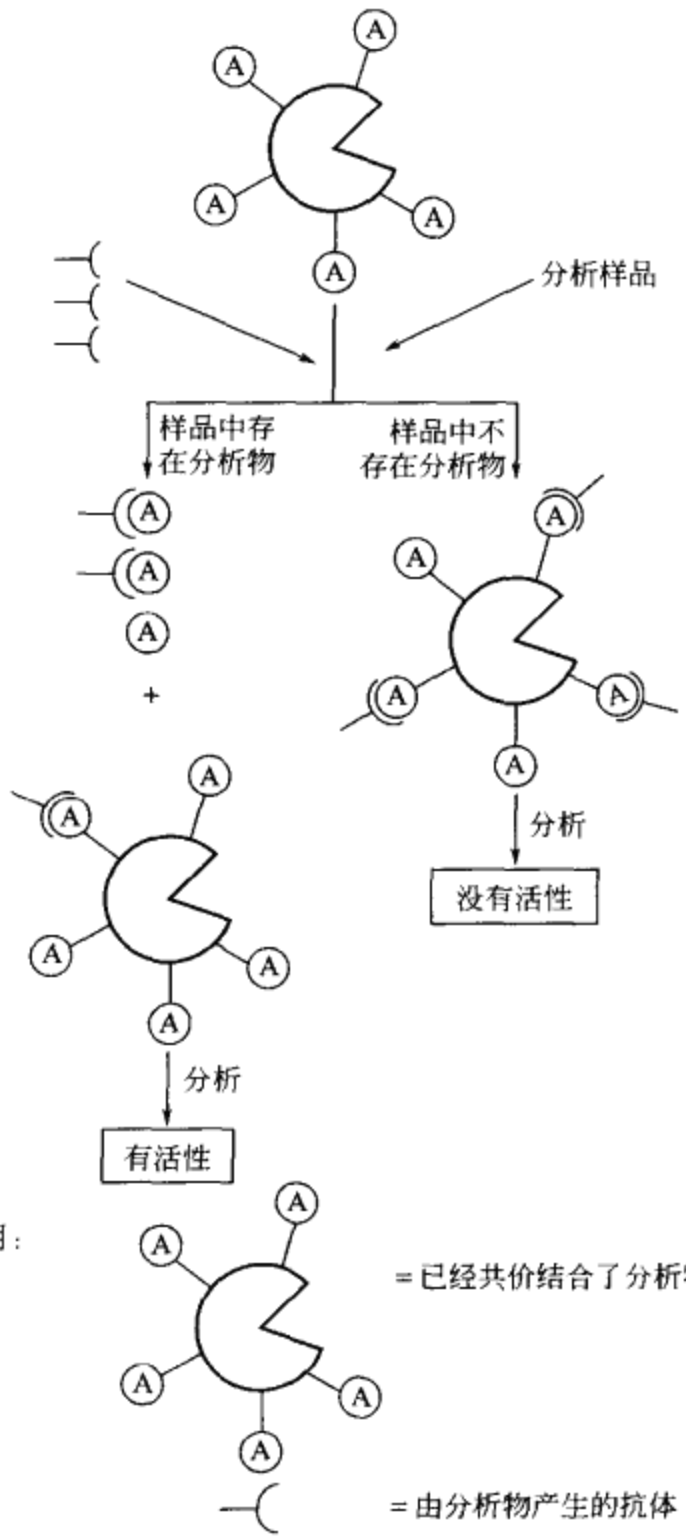


图 9.9　酶多重免疫分析技术的简单原理

待检测的分析物的纯化制品共价连接于选定的酶上，这个过程不一定会导致酶灭活。与目标分析物特异结合的抗体也需要。当进行测试的时候，抗体以有限的量加入到酶分析物的耦联体中，被分析的样品也加入。如果样品中存在分析物，它就会同耦联的分析物进行竞争，与抗体结合，这样酶就会保持最大或接近最大的活性。活性使用发色物质来定量。但是，如果分析样品中不存在分析物，抗体只能与酶-分析物耦联体结合，就会很大程度上或全部灭活酶。标准曲线可通过分析已知分析物浓度的样品来建立；分析物浓度与记录的活性水平成比例

说明：抗体与分析物-酶耦联体结合可能以两种机理降低酶活力：①诱导酶构象的变化；②由于较高的分子量，抗体以空间位阻的方式阻挡底物进入活性部位。对于任何给定的 EMIT 系统，可达到的抑制水平依赖于正确的酶和待分析的分析物、分析物替代品的水平和分析物与酶结合的方式

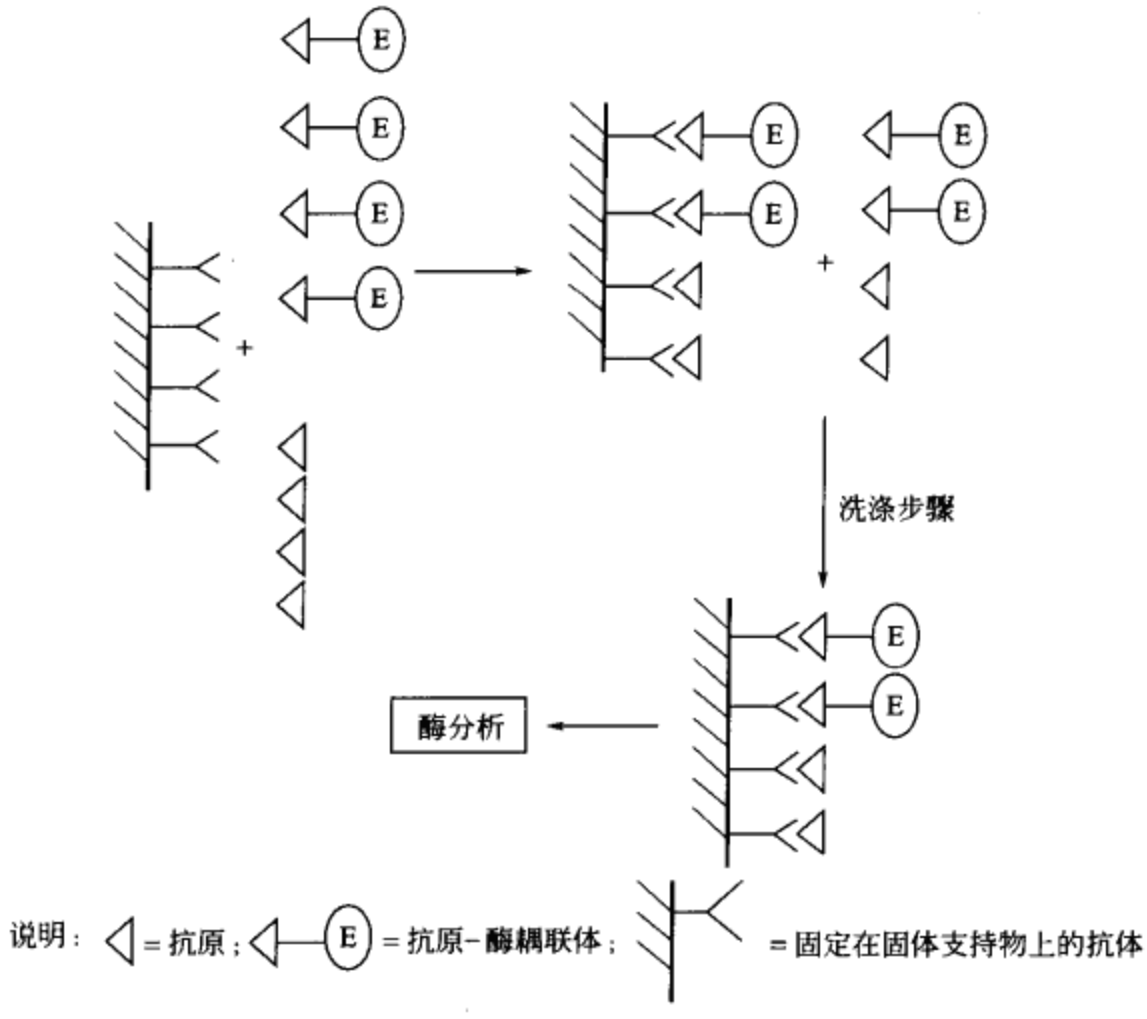


图 9.10　竞争性固相 EIA 原理

结合的酶活力与待测样品中存在的未标记的抗原数量成反比

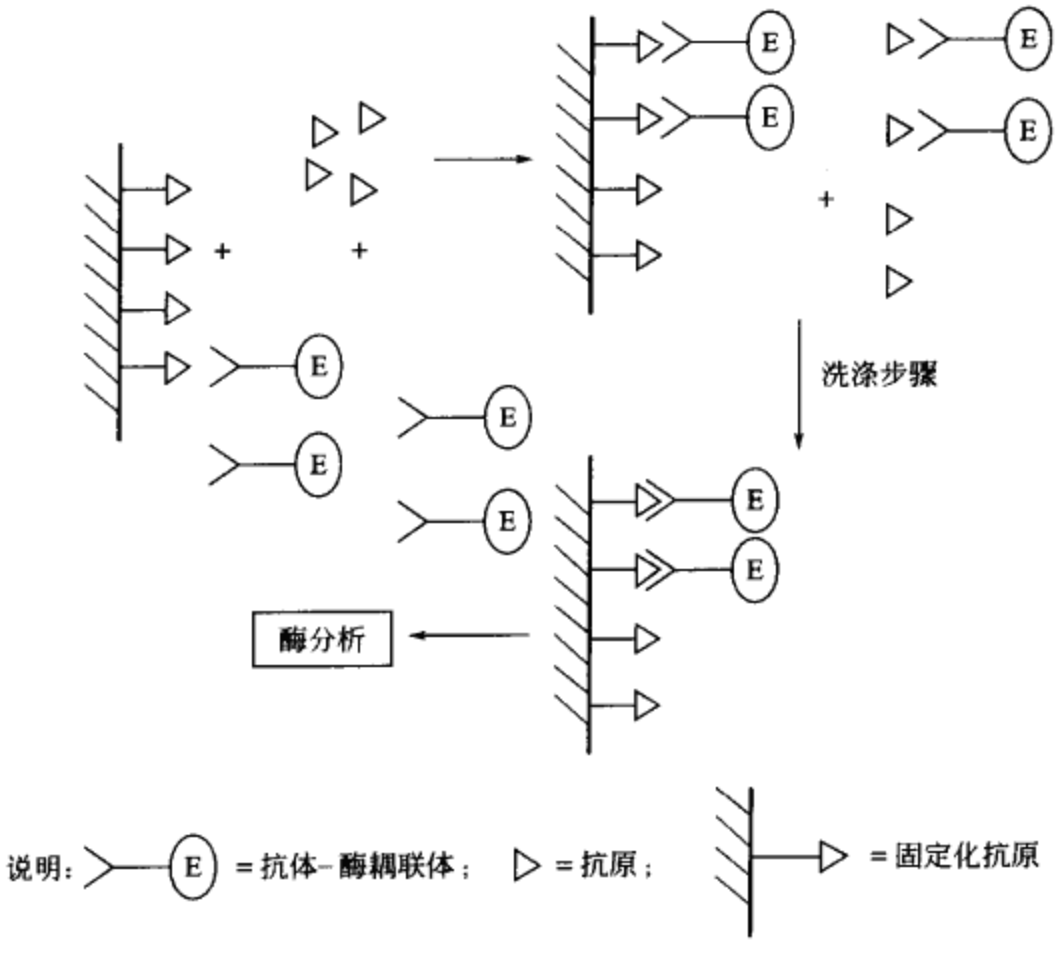


图 9.11　使用固定化抗原的酶免疫分析系统

分析样品中存在的抗原水平越高，滞留在固相上面的酶-抗体耦联体的水平就越低，因此记录的酶的活性水平就越低

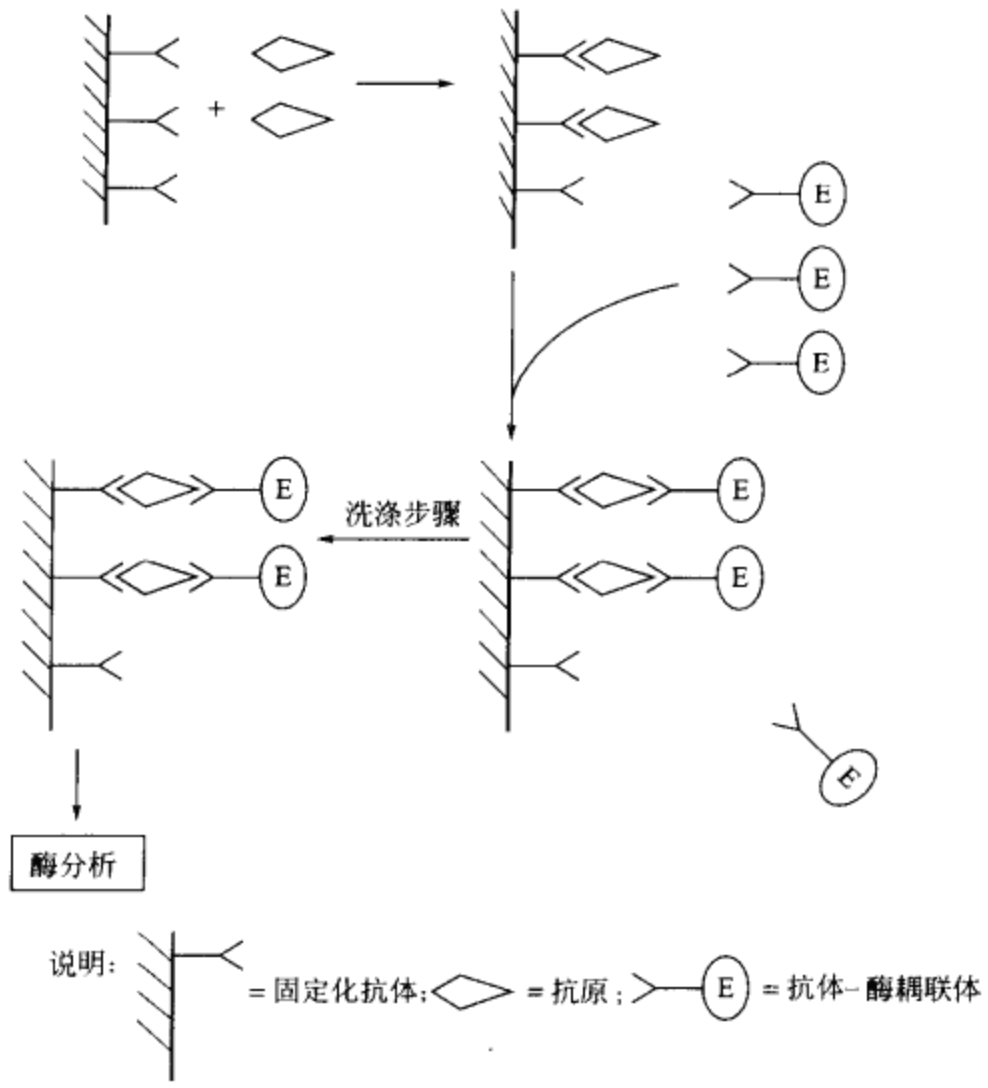


图 9.12　非竞争性 ELISA 原理

适合的时间，使得抗体-抗原结合达到平衡，洗涤微孔。

然后加入含有二级抗体的制品，它也能识别抗原。如果使用单克隆抗体，这第二个单克隆抗体（单抗）识别的抗原表面的表位必须与一级或固定化单抗识别的表位不同。二级抗体也能结合在捕获的抗原上，酶标记耦联在二级抗体上。接下来进一步的洗涤步骤除去未结合的抗体-酶耦联体，分析留下的酶活力。记录的活性与分析样品中的抗原量成比例。可以分析一系列的标准抗原浓度以建立标准曲线，标准曲线有利于计算存在于未知样品中的抗原量。

9.4.4　在酶免疫分析中使用的酶

已有多种酶作为标记用在各种 ELISA 系统中。被选定的适合的酶要符合多个标准，除了催化活性，一个明显的标志就是被选酶的活性能被很容易地监控。多种使用的酶能产生有颜色的产物，它可通过颜色测量的方法来轻易监控。大部分经常用作标签的酶除了 β-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶和尿素酶外，还包括碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶，所有这些酶都能利用适合的生色底物。

从牛小肠分离出来的碱性磷酸酶是最初用于 ELISA 系统的酶之一，通常使用的底物是对硝基苯磷酸（para-nitrophenylphosphate，PNPP）。PNPP 由碱性磷酸酶催化水解，释放出无机磷酸和对硝基苯（para-nitrophenol，PNP），PNP 是黄色的，在 405nm 处有最大吸收。β-半乳糖苷酶使用的底物通常是邻硝基苯 β-D-吡喃型半乳糖，在 420nm 处可测到颜色形成。如果使用荧光底物，可由这些酶促系统更灵敏地检测产物。

把选定的酶共价耦联或结合在 ELISA 系统中使用的二级抗体上，可通过多种化学方法

来实现。最简单的一种方法就是戊二醛的化学结合（图 9.13），它是一种同源双功能试剂（它的两个反应基团与两个相似的蛋白质一起结合）。戊二醛与赖氨酸的ε-氨基不可逆转地反应，形成共价连接。由于简单和便宜，戊二醛方法使用得很广泛。但是所有的结合方法都有可能导致一部分耦联酶分子和抗体的灭活。

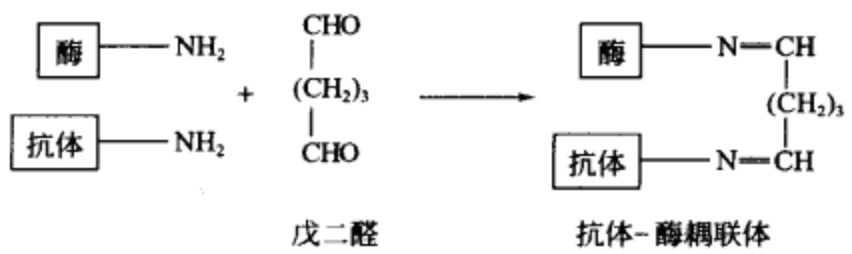


图 9.13　使用戊二醛把酶化学耦联到抗体上

游离的酶与游离的抗体的氨基是赖氨酸残基的ε-氨基。反应孵育 1h 或更长。为了有效地终止耦联过程，加入过量的游离赖氨酸。没有反应的戊二醛也可通过透析等方法除去。这个过程除了酶-抗体耦联物外，不可避免地还会产生一部分抗体-抗体、酶-酶耦联物。如果需要的话，接下来可采用如凝胶过滤层析的方法来分离它们

9.4.5　免疫分析发展的趋势

在许多更现代化的免疫分析系统的设计中可观察到几种明确的趋势，这些免疫分析系统中加入非同位素检测系统的比例在增长，在免疫分析中加入酶促检测系统已经非常普及，辣根过氧化物酶是在这些系统中最经常使用的酶。它的普及性反映了其极高的催化效率、相对较小的体积以及在各种特异的和敏感的分析系统中的适用性，在其中过氧化物酶的活性可被监控。在 EIA 中碱性磷酸酶可能是作为标签使用的最为普遍的另一种酶。

越来越多的新分析方法也是基于固相系统。这通常使得分离游离的与固定的抗原相当直接。使用单抗的新分析系统也在稳定增长。与多克隆制品相比，单抗显示了较高的特异性。单抗技术能够连续地供应具有明确特异性的抗体。

重组 DNA 技术也持续影响免疫分析技术。除了利用重组技术制造多种有用的 EIA 报告酶外，还可产生工程抗体或抗体片段。在这方面利用重组 DNA 技术的很好的例子是关于克隆酶免疫分析（cloned enzyme immunoassays，CEDIA）的发展。CEDIA 是一种利用 β-半乳糖苷酶的重组互补灭活片段的同源竞争免疫分析，像图 9.14 描述的那样。

现代免疫学分析也变得使用者更加便于掌握了。在临床实验室中，可通过设计和安装自动的和半自动的分析仪来实现，也可通过修改免疫分析方法学以改善这些自动系统的使用来达到目的。使用者更易掌握的分析试剂盒也已经发明了，没有经过科学训练的人员可在实验室外使用。这样的分析系统的典型例子是怀孕检测试剂盒，在柜台上出售，适合家庭使用。这些试剂盒将在本章末进行讨论。

9.4.6　人体免疫缺陷病毒的免疫学分析

目前用于检测人体免疫缺陷病毒（HIV）感染的诊断试剂盒在世界范围内的销售已超过 10 亿美元。很多早期试剂盒主要用于筛查存在于供血和血制品中的 HIV。最近，这种试剂盒除了用于那些为了移民到某个国家或被考虑雇佣到多种行业必须证明他们是 HIV 阴性的人以外，用于筛查高危人群的比例正在增长。

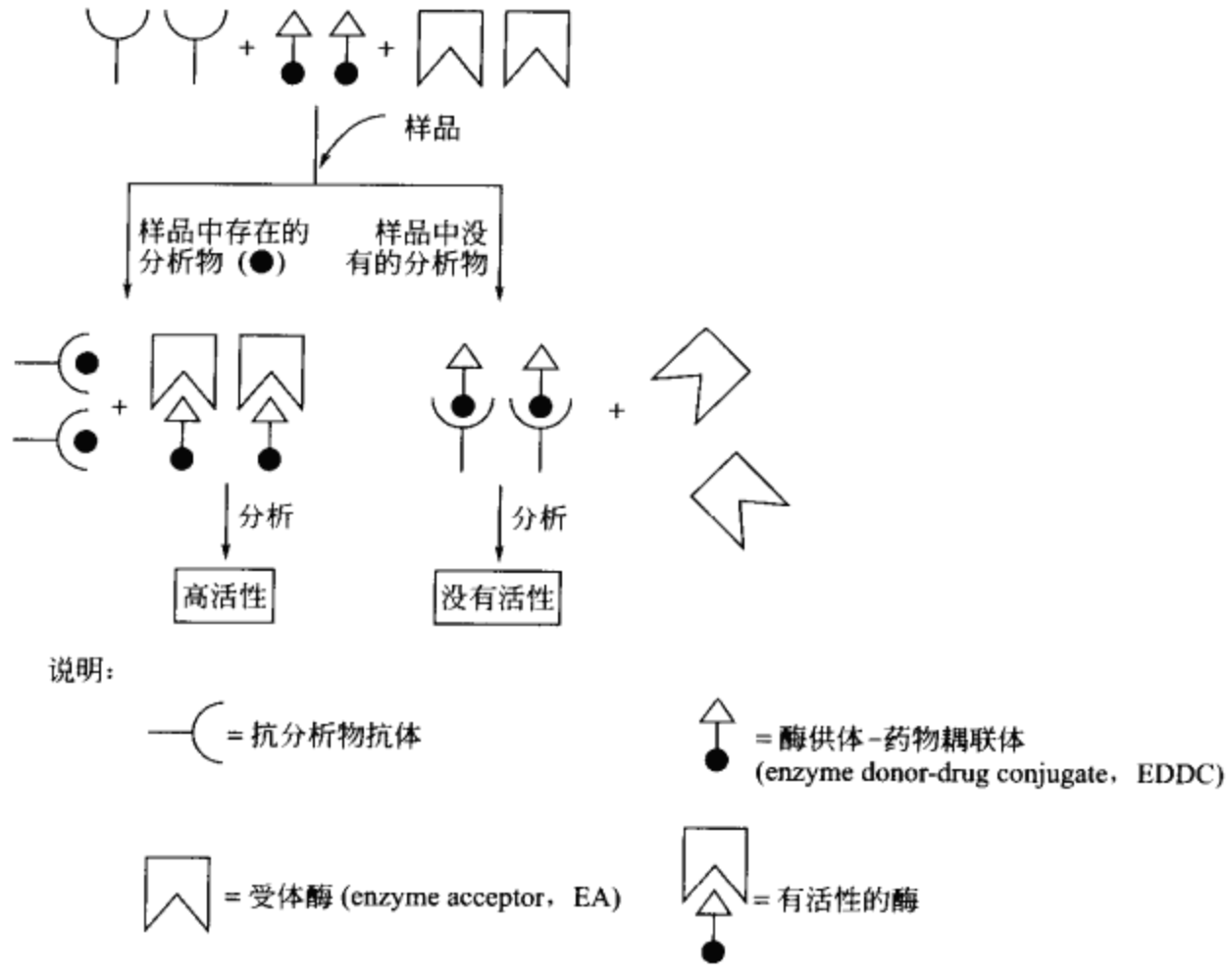


图 9.14　克隆酶免疫分析系统 CEDIA 的简图

分析的中心是由重组方式产生的 β-半乳糖苷酶的互补片段。一个片段命名为酶供体（enzyme donator，ED），另一个为酶受体（enzyme acceptor，EA）。当混在一起时，它们自发形成有活性的 β-半乳糖苷酶。该分析试剂盒包括与目标分析物特异结合的抗体、耦联到目标分析物上的酶供体和酶受体。如果待分析样品中存在目标分析物，它就会被抗体结合。这样耦联的 ED 和 EA 处于游离状态会相互作用，产生有活性的酶。然后酶转化合适的发色底物，产生能通过分光光度计定量的有色产物。当样品中没有目标分析物时，抗体与耦联在 ED 上的分析物结合，这就阻止了与 EA 的结合，因此也就阻止形成有活性的 β-半乳糖苷酶复合体，最终没有记录到活性。含有不断升高的已知浓度的分析物的分析样品可产生标准曲线

已经发明了能够识别 HIV-1 和 HIV-2 的分析系统，HIV-1 是工业化国家主要的艾滋病传染种类，HIV-2 是在非洲的主要传染因子。但是到目前为止，市场上大部分诊断系统是特异检测 HIV-1 的。

一旦感染了 HIV，宿主的免疫功能就会启动免疫反应。这可以以血清中存在抗-HIV 抗体为特征。感染的个体通常会没有症状，在发展为艾滋病相关的综合征和接下来是完全的艾滋病之前，在几年内疾病都不会发展。所有感染了病毒的个体中出现抗-HIV 抗体构成了绝大多数 HIV 诊断系统的基础。大多数这样的系统是酶免疫分析形式，主要是 ELISA。

在这些系统中，HIV 抗原固定在支持物表面，例如微孔板的孔内。被分析的血清样品孵育在这些孔内，使得存在的抗-HIV 抗体与固定抗原结合。洗涤之后，加入能特异与人抗体结合的第二抗体。合适的酶标记物，例如辣根过氧化物酶耦联在这个第二抗体之上，接下来未结合的耦联体通过洗涤除去，剩下的酶活力通过适合的分析系统检测。剩下的活性水平与待分析血清样品中存在的抗体数量成比例。这个过程以图示的方式总结在图 9.15 中。这种方法内在的一个缺点是在感染之后很短的时间内存在窗口期，在这期间检测不到任何抗-HIV 抗体。

最初的 ELISA 系统使用从组织培养中生长的 HIV 颗粒部分纯化而来的固定抗原。但是现在的 ELISA 系统使用由重组 DNA 技术制造的特异又高度纯化的 HIV 抗原。编码 HIV 蛋

白的基因，如 p24（核心蛋白）、gp41、gp120 和 gp160（膜蛋白），都已在重组系统中表达。通过重组方式产生的蛋白质不仅排除了与真正的病毒本身一起工作的危险，也保证了生产确定的抗原。这就提高了 ELISA 的敏感性和特异性，将假阳性反应的发生概率降到最低。

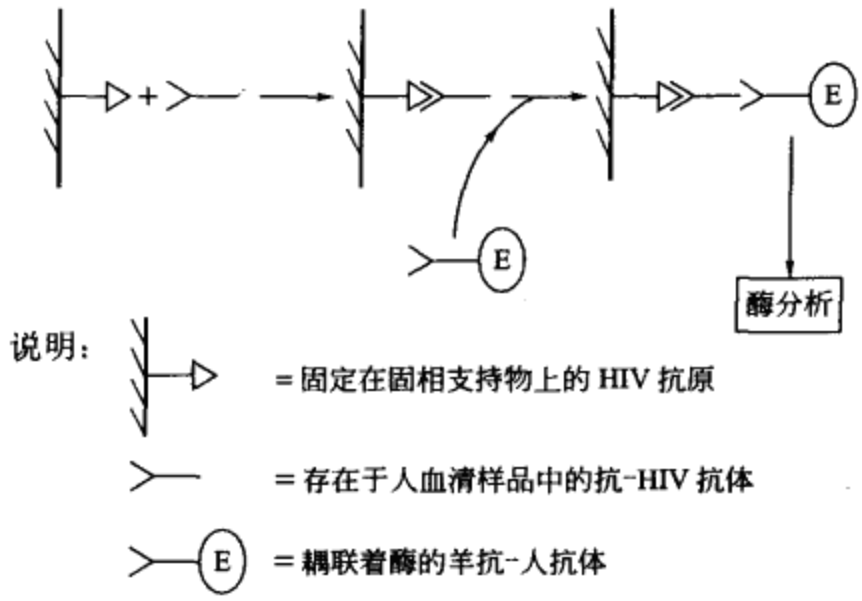


图 9.15　用于检测分析样品中抗-HIV 抗体的 ELISA 系统

也试图发明基于检测尿中或唾液中的抗-HIV 抗体的免疫分析来诊断 HIV 感染。比起收集血样，后者的收集更容易而且危险性更小。但是到目前为止发明的大多数免疫分析对这种方法并不足够敏感。当血清中 IgG 的平均浓度是 15mg/ml 时，唾液和尿中的水平分别平均在 35μg/ml 和 4μg/ml。发展更敏感的抗-HIV 分析方法的各种尝试仍在进行之中。其中最有希望的是检测抗-HIV 抗体的免疫复合物转移 EIA 系统的使用（图 9.16）。

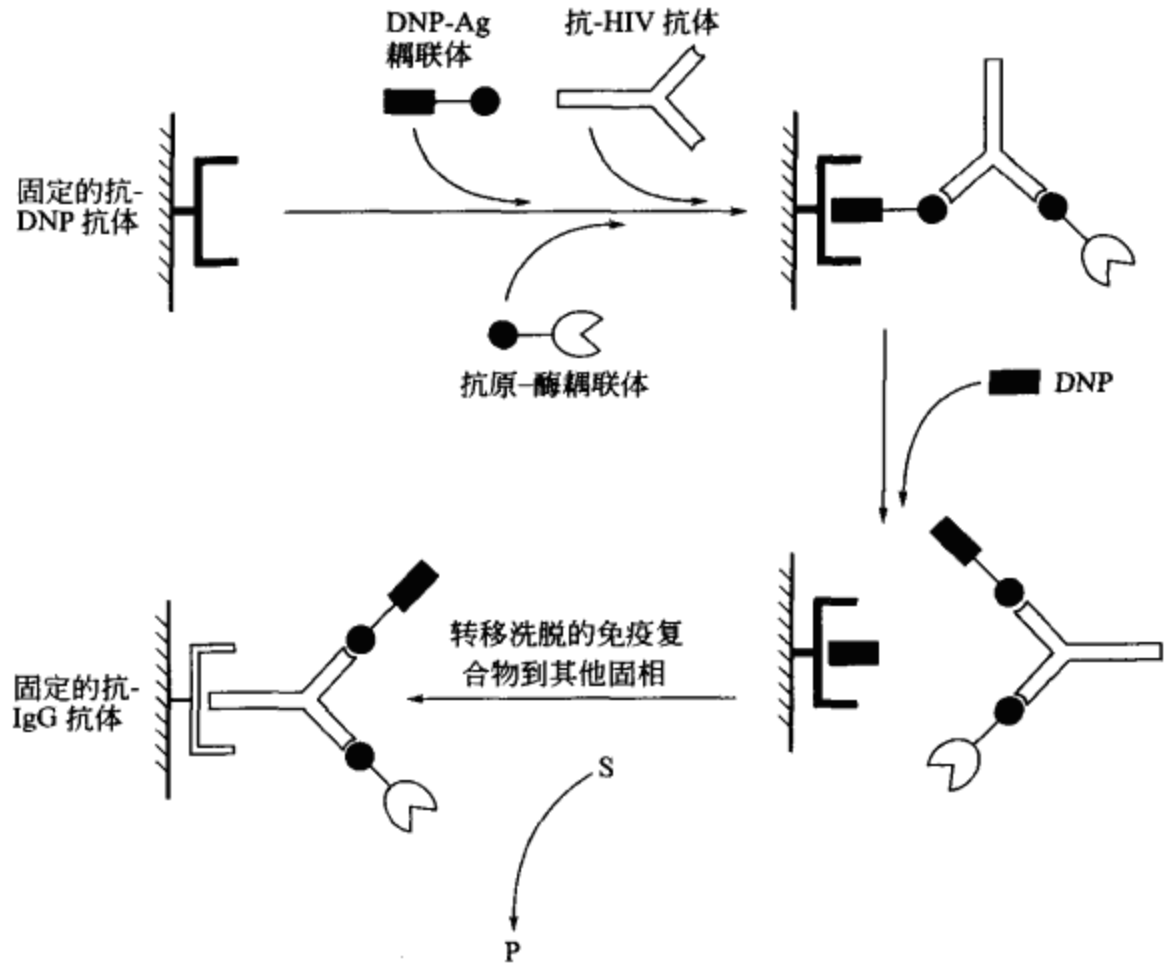


图 9.16　用于检测和定量生物样品中的抗-HIV-1 的免疫复合物转移 EIA

生物样品与两个耦联体（耦联体 1＝耦联到 2,4-二硝基苯酚基团上的 HIV 抗原，耦联体 2＝耦联到适合的酶上的抗原）一起孵育在含有固定的抗-二硝基苯酚（dinitrophenyl，DNP）抗体的小孔内，这就捕获了如孔内所示的三种物质组成的免疫复合物。洗涤之后，通过添加游离的 DNP（或与赖氨酸相连接的 DNP），免疫复合物从固相上被洗脱下来。然后洗脱的复合物转移到含有固定化的抗-人 IgG 抗体的新的固体上，这就导致了如图所示的免疫复合物的固定。另一次洗涤之后，加入适合的底物，转化为产物，通常是由荧光来检测抗-HIV 抗体的存在。从固相转移到固相的转移步骤在很大程度上降低了非特异信号，有助于提高分析系统的敏感性

9.4.7 其他免疫分析应用

非竞争性的、二位点的“夹心”免疫分析如 ELISA 已得到了广泛的商业应用。这些分析的应用要求目标分析物足够大以至于它能够被诱捕在捕获抗体和检测抗体之间（图 9.12）。许多低分子量的物质（如多种药物、代谢物和污染物）太小了就不能通过这种方法分析。这种情况下通常使用竞争性异源分析。现在的研究文献包含几百种用于检测和定量这些低分子量物质的免疫分析的例子。很多这种免疫分析的商业化由于各种原因发展缓慢，表现在其他分析方法得以发展的事实。例如，传统上食物残留成分的分析（如杀虫剂、除草剂、兽药、植物和微生物毒素等）主要依赖于气相色谱法或液相色谱法。

尽管对于检测多种污染物已存在令人满意的色谱技术，但是为了食品和环境监控的目的还是发展了越来越多的免疫分析方法（表 9.6）。反映在不断加强的环境立法上环境意识的提高现在使得普通的常规环境测试成为可能，这就给适合的分析技术提供了现成且可靠的市场。

表 9.6 用于选择和定量食物样品中的特定杀虫剂的一些酶免疫分析系统

杀 虫 剂	食 物 类 型	样品预处理	检测限度
甲草胺	谷物	碾碎，用甲醇-水提取	20μg/kg
氯甲桥萘	鸡蛋	除去蛋壳，均一化，稀释	6ng/ml
莠去净	牛奶、果汁	不用处理	0.03μg/kg
苯并咪唑	牛肝	用 DMF、水或柠檬酸提取	0.3μg/kg
胺甲萘	苹果和葡萄汁	不用处理	2ng/ml
Difenzoquat	小麦和大麦产物	用 HCl 提取	16ng/g
左旋咪唑	肉、牛奶	在缓冲液中均一化(肉)	1μg/kg
methoprene	小麦	用甲醇或乙腈提取	60μg/kg
Triadimefon	水果	用甲醇提取	2.4ng/ml

注：一些食物（例如牛奶和果汁）由于它们的特性能被直接分析。在其他情形中（例如肉）必须首先经过适合的杀虫剂提取步骤，再测试提取物。

源自 Dankawardt A & Hock B (1997)，Food Technol. Biotechnol.，35 (3)，170.，已做了部分修改。

免疫分析在药物测试方面也占有一席之地。检测药品的存在（尤其是在运动员和医院急诊危重病人的药物滥用中）具有很明显的重要性。这些测试使用血清或尿样（更普遍），最普通的目标分析物包括多种代谢的类固醇、安非他明、麻醉剂、可卡因代谢物、美沙酮和巴比妥酸盐。

9.4.8 基于乳胶和其他的免疫分析系统

除了经典的 RIA 和 EIA 外，也发展了其他免疫分析形式。基于乳胶的和基于膜的免疫分析代表了两种其他系统。

基于聚苯乙烯的乳胶物质的单一球形颗粒，在各种免疫学为基础的诊断系统中得到了广泛应用。大部分乳胶由聚苯乙烯制造，通常使用的颗粒直径在 0.1～1.1μm 之间。因此单个的乳胶颗粒对于没有辅助设施的人眼是看不到的。乳胶与蛋白质溶液的孵育导致蛋白质分子吸附在乳胶颗粒表面。另外，各种反应基团最初也可引进到乳胶内，这就使蛋白质能够与这些颗粒共价连接。

包被着抗体的乳胶颗粒可被用来检测生物样品中存在特异抗原。相反，用包被特异抗原的乳胶颗粒可用于检测识别特异抗原的抗体的存在。基于乳胶的诊断系统依赖于抗原-抗体反应的内在特异性，和促进乳胶颗粒凝集的抗体结合的双功能特性。乳胶颗粒被红细胞代替

的一些诊断试剂盒也得到了应用。

像图 9.17 说明的，当包被了由特异抗原产生的抗体的乳胶颗粒与含有那个抗原的生物样品共孵育时，接下来的抗原-抗体反应导致了乳胶颗粒大聚集体的形成，也就是乳胶聚集物。抗原有效地作为相邻乳胶颗粒的桥梁。当新凝集的颗粒在肉眼下清晰可见时，凝集的过程就明显可见了。

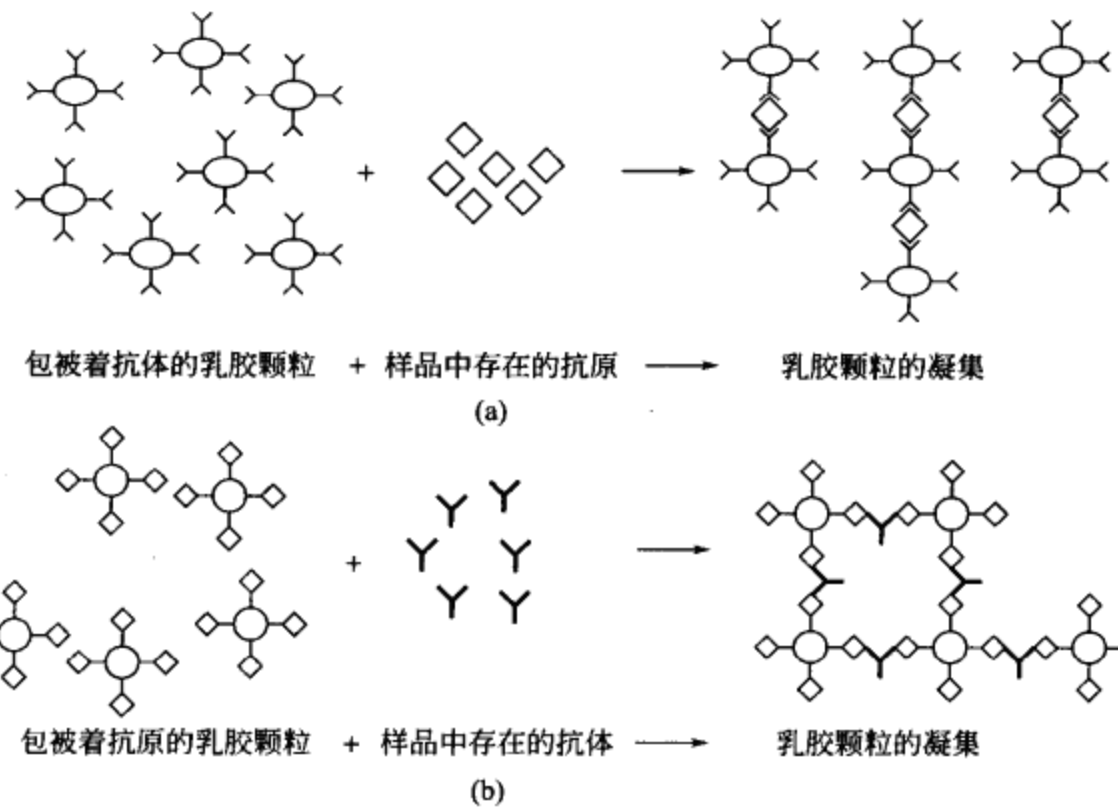


图 9.17　乳胶凝集分析系统

在（a）中乳胶颗粒已被抗体包被。检测样品中适合抗原的存在导致乳胶颗粒的凝集。存在的抗原有效地作为邻近乳胶颗粒之间的桥梁。在（b）中乳胶颗粒已被抗原包被。在这种情况下分析样品中适合抗体的存在导致了乳胶的聚集，也就是抗体作为邻近乳胶颗粒之间的桥梁，凝集可通过视觉轻易可见

事实上，这些分析系统是通过把待分析生物样品与样品抗体或抗原包被的乳胶混合起来启动的。如果样品含有适合的抗原或抗体，乳胶就会凝集。当同源的牛奶状的乳胶混合物形成更大的颗粒状时，凝集过程在视觉上可见。凝集的乳胶颗粒与离散的沙子看上去很相似。

由于多种原因，基于乳胶的分析应用很普遍，最显著的原因是获得结果的速度和很少甚至不需要专门仪器。乳胶分析通常在塑料包被的卡片上进行。这些卡片在表面上有一系列圆形缺口。乳胶和待检测样品共同孵育在一个这样的表面缺口中，然后卡片轻轻地前后摇摆以确保乳胶和样品的持续混合。相对于典型的 EIA 需要 2h 出结果来说，如果凝集发生了，在 3～5min 内就可看到。

乳胶测试基本上是定性的。可通过分析一系列的含有抗原的样品稀释物，直到凝集不再发生来进行半定量估计。在这样的系统中，促进凝集所需要的最低的抗原浓度是由分析一系列的抗原标准品稀释物来决定的。干扰物质的存在，尤其是在未稀释的血或尿样中，在某些情况下可能产生假阳性结果。

已经发明了大量的基于乳胶的分析系统，许多得到了广泛应用。有用的基于乳胶诊断系统的例子包括设计用来检测怀孕、各种感染因子的那些系统和检测与关节炎相关的各种血清因子的系统。

在移植入受精卵不久，人胎盘就开始合成和分泌人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotrophin，hCG，第 7 章），hCG 在健康没有怀孕的妇女体内并不合成，但是这种激素在怀孕妇女的血清和尿中都能发现，因此 hCG 成为怀孕的理想诊断标志。因为尿样可以

很方便地收集，可以在怀孕妇女尿中检测出的事实使它更加令人满意。

很多最初基于 hCG 的怀孕检测分析是以生物分析为基础的。包括将尿样注射到未成熟的雌性兔子或大鼠体中，这些动物卵泡的生长和成熟表明 hCG 存在，也就是怀孕了。现代的怀孕检测技术事实上是基于尿样中 hCG 的免疫学检测。除了基于乳胶的颗粒凝集分析，RIA 和 ELISA 系统也可使用。

大多数基于乳胶的怀孕检测系统利用包被着抗-hCG 抗体的乳胶，这样尿样中存在 hCG 促进乳胶粒子的凝集。这样的系统被命名为直接分析系统，其原理在图 9.18（a）中说明。

其他以乳胶为基础的间接检测试剂盒利用包被 hCG 的乳胶颗粒。在这样的间接分析系统中，三种成分共同孵育在一起。最初，抗-hCG 抗体与尿样孵育在一起，然后加入乳胶颗粒，如果样品来自于怀孕妇女，样品中存在的 hCG 就会与抗-hCG 抗体结合。这样所有的游离 hCG 和抗-hCG 抗体就清理干净了。因此在这种情况中，除了加入的乳胶粒子，看不到凝集，该过程在图 9.18（a）中说明。

另一方面，如果这种间接分析系统的样品来自于非怀孕的妇女，提供的尿样中就没有

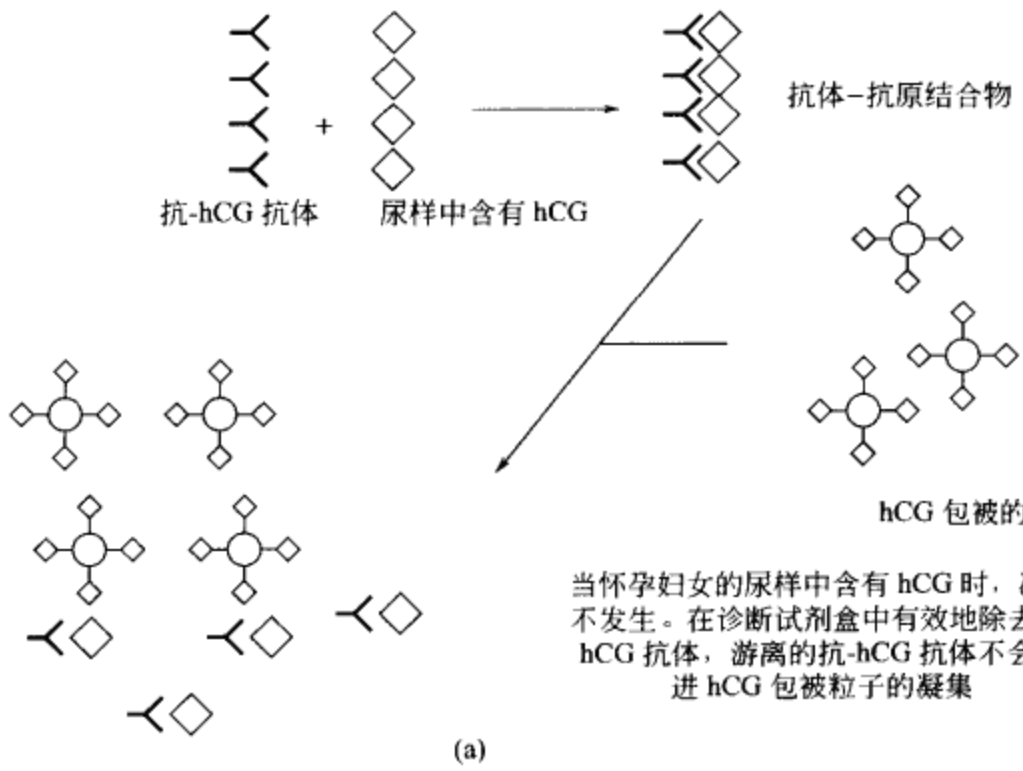


图 9.18　以乳胶为基础的间接怀孕检测系统

（a）当检测来自于怀孕妇女的尿样时发生的一系列事件；（b）当检测来自于非怀孕妇女的尿样时发生的一系列事件

hCG。这样，最初与尿样混合的抗-hCG 抗体的结合位点就一直空着。因此在这种情况下，一加入 hCG 包被的乳胶粒子之后就会观察到凝集［图 9.18（b)］。

多种感染因子的存在也可通过多种基于乳胶的系统来指明，多种这样的系统利用包被着能识别与感染因子相关抗原的抗体的乳胶颗粒。但是这样的系统也可利用直接包被着抗原的乳胶颗粒。这些颗粒的凝集表明分析血清样品中存在抗-抗原的抗体。当然，这也表明测试个体已经接触了被怀疑的感染因子，并对它产生了免疫应答。

这些商业上可用的基于乳胶系统的例子包括检测乙型肝炎（乙肝)、梅毒和 HIV 的系统。大部分乙肝乳胶凝集检测是基于血样与包被着乙肝表面抗原产生的抗体的乳胶颗粒。凝集表明样品中存在乙肝颗粒。

一些基于乳胶的梅毒检测利用包被着抗原的乳胶颗粒，抗原纯化自梅毒螺旋体（*Treponema pollidum*)，梅毒的致病因子。如果分析血样中含有抗这种细菌的抗体，凝集就会发生。血样中这些抗体的存在表明样品供者已经接触了梅毒螺旋体。大多数基于乳胶的 HIV 检测使用包被着重组 HIV-1 抗原的乳胶粒子。

几种基于乳胶的诊断检测在风湿病学中也得到了广泛应用。这样的系统包括那些用来检测类风湿因子（rheumatoid factor，RF）和 C 反应蛋白（C-reactive protein，CRP）存在的系统。类风湿因子是与人 IgG 特异结合的自身抗体，CRP 是一种血清蛋白，在急性感染之后其浓度会增高几百倍。

9.4.9　与膜相结合的诊断系统

固定在膜（例如硝酸纤维素膜）上的抗体，也可用作诊断试剂。由于经过深思熟虑的设计，这些系统大大提高了使用的简便性，尤其是设计用来检测怀孕的系统。这一点在下面以膜为基础的 hCG 检测系统的总结中会说明。这种和其他相似的系统已经应用很普遍，通常由药剂师或其他销路在柜台上出售。

在这个系统中，两行很细的抗体以交叉形式喷洒在硝酸纤维素表面（图 9.19)。这个过程通过专门的工业喷洒设备来完成。沿着一条线的抗体特异结合 hCG，沿着另一条线的抗体结合碱性磷酸酶。当然，这个步骤中两个抗体线对人眼来说都是看不到的。这个系统中另一个成分是耦联着碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AP）的抗-hCG 抗体的冻干制品。测试尿样用于重建这个抗体-酶耦联物。然后重建的耦联物与膜表面进行接触。

来自于非怀孕妇女的尿样不含有 hCG。因此，由尿样重建的抗体-酶耦联物的 hCG 结合位点没有被占领。当样品与膜表面接触时，耦联物通过 AP 结合到抗-AP 抗体线上（图 9.19 中的线 1)。因为在尿样中不存在 hCG，没有东西结合到抗-hCG 抗体线上（图 9.19，线 2)。

为了除去未结合的物质，冲洗膜之后，把它浸到含有碱性磷酸酶生色底物例如 PNPP 的溶液中。由于存在结合的 AP，沿着抗-AP 抗体的线就会看到颜色形成［图 9.20（a)］。由于没有 hCG，沿着线 2 没有颜色形成。这样负（－）标志就产生了表明这位女性没有怀孕。

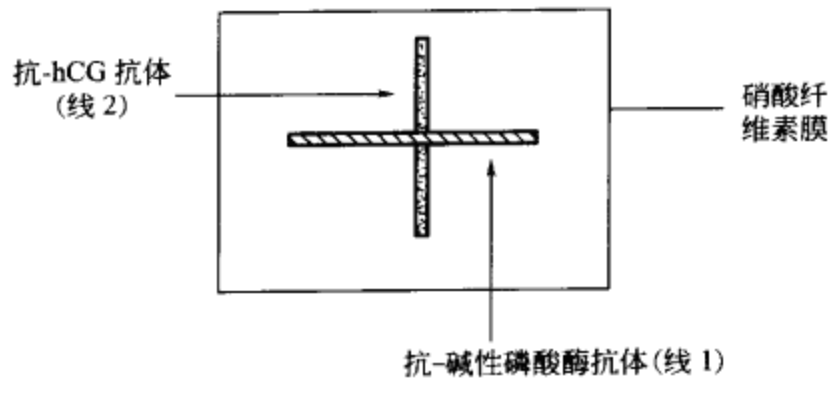


图 9.19　膜结合的怀孕（hCG）检测系统

另一方面，怀孕的妇女中确实存在

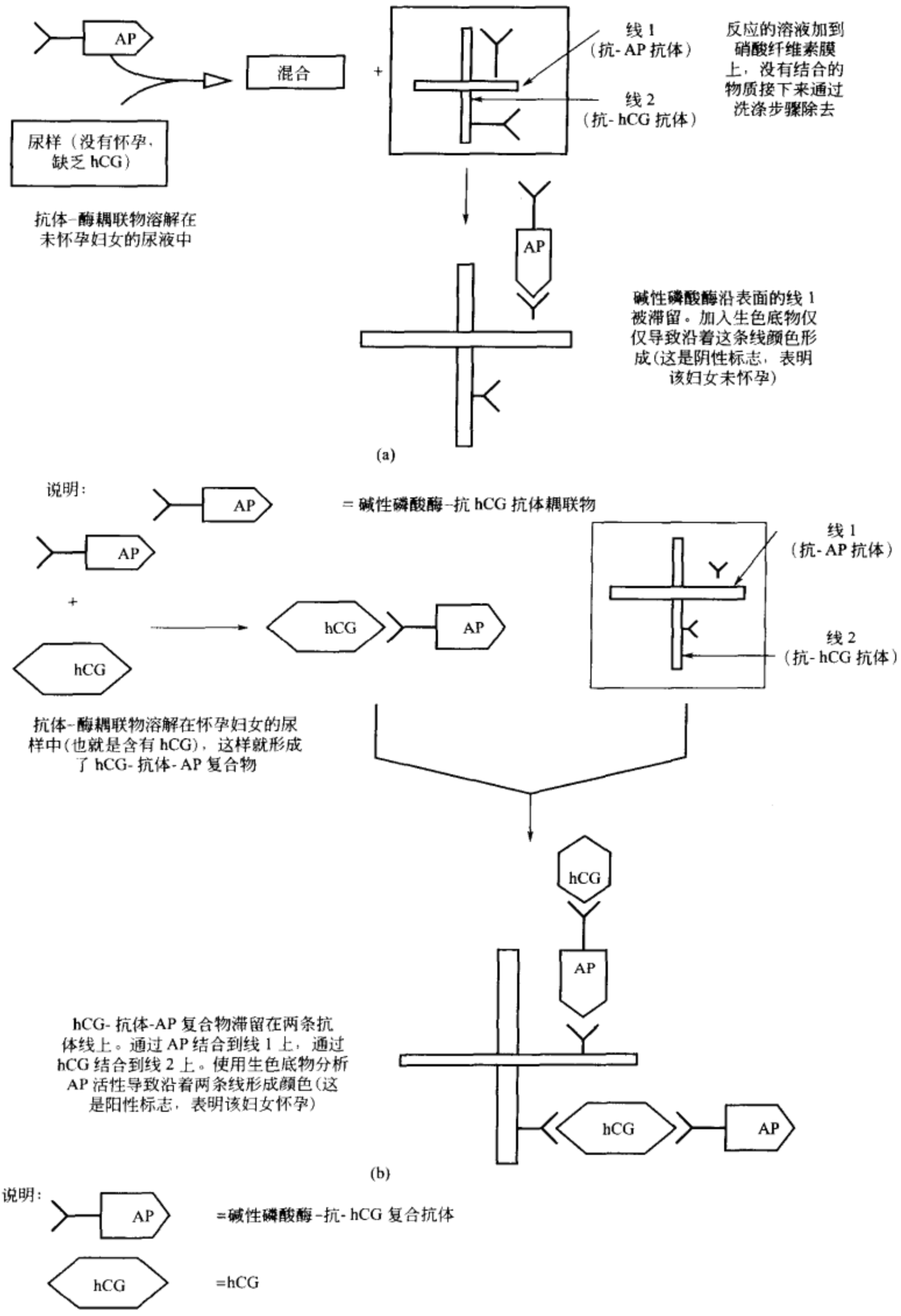


图 9.20　膜结合 hCG（怀孕）检测试剂盒的原理

（a）妇女没有怀孕产生的结果；（b）妇女怀孕产生的结果

hCG，hCG 被结合到在尿中重建的酶-抗体耦联物上。在这种情况下，耦联物一接触到膜表面，就会与两条抗体线结合。通过 AP 分子耦联物结合抗体线 1，因为 hCG 作为桥梁，结合到线 2（也就是抗-hCG 抗体线）。像图 9.20（b）中说明的那样。在这种情况下，膜浸入到成色溶液中导致沿着两条线形成颜色，也就是得到了正（+）标志，表明怀孕。

9.5　进一步的阅读材料

图书

Edwards, R. (1999) *Immunodiagnostics*. Oxford University Press, Oxford.

Eggins, B. (1998) *Biosensors*. John Wiley & Sons, Chichester.

Gaw, A. *et al*. (1999) *Clinical Biochemistry*. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Godfrey, T. (1990) *Industrial Enzymology*. MacMillan Press, Basingstoke.

Gosling, J. (2000) *Immunoassays*. Oxford University Press, Oxford.

Mulchandani, A. (1998) *Enzyme and Microbial Biosensors*. Humana Press, New York.

Ngo, T. (2000) *Biosensors and their Applications*. Plenum Press, New York.

Price, C. (1996) *Principles and Practices of Immunoassay*. MacMillan Press, Basingstoke.

Scott, D. (1998) *Biosensors for Food Analysis*. Royal Society of Chemistry, London.

Sonnleitner, B. (1999) *Bioanalysis and Biosensors for Bioprocess Monitoring*. Springer-Verlag, Godalming.

Wild, D. (2001) *Immunoassay Handbook*. MacMillan Press, Basingstoke.

论文

分析用酶

Burkhard-Kress, G. (1995) Analytical uses of enzymes. In *Biotechnology, a Multi-volume Treatise*, 2nd edn, Vol. 9, 138-163. VCH, Weinheim.

Freedman, D. *et al*. (1986) The relation of apolipoproteins A-1 and B in children to parental myocardial infarction. *N. Eng. J. Med.* **315**, 721-726.

Klotzsch, S. & McNamara, J. (1990) Triglyceride measurements: a review of methods and interferences. *Clin. Chem.* **326** (9), 1605-1613.

Kopetzki, E. *et al*. (1994) Enzymes in diagnostics; achievements and possibilities of recombinant DNA technology. *Clin. Chem.* **40** (5), 688-704.

MacLachan, J. *et al*. (2000) Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **72** (5), 169-195.

Price, C. (1983) . Enzymes as reagents in clinical chemistry. *Phil. Trans. R. Soc. London* **B300**, 411-412.

免疫分析

Beltz, G. *et al*. (1989) . Development of assays to detect HIV-1, HIV-2 and HTLV-1 antibodies using recombinant antigents. In: *Molecular Probes: Technology and Medical Applications*, pp. 131-142, Albertini A *et al*. (eds), Raven Press, New York.

Bock, J. (2000) The new era of automated immunoassay. *Am. J. Clin. Pathol.* **113** (5), 628-646.

Borrebaeck, C. (2000) Antibodies in diagnostics-from immunoassays to protein chips. *Immunol. Today* **21** (8), 3789.

Gosling, J. (1990) A decade of developmeny in immunoassay methodology. *Clin. Chem.* **36** (8), 1408-1427.

Gottfried, T. & Urnovitz, H. (1990) HIV-1 testing: product development strategies. *Trends Biotechnol.* **8**, 35-40.

Hage, D. (1999) Immunoassays. *Anal Chem.* **71** (12), 294R-304R.

Labeur, C. *et al.* (1990) Immunological assays of apolipoproteins in plasma: methods and instrumentation. *Clin. Chem.* **36** (4), 591-597.

Ronald, A. & Stimson, W. (1998) The evolution of immunoassay technology. *Parasitology* **117**, S13-S27.

Schlageter, M. (1990) Radioimmunoassay of erythropoietin: analytical performance and clinical use in haematology. *Clin Chem.* **26** (10), 1731-1735.

Biosensors

Ivnitski, D. *et al.* (1999) Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors Bioelectr.* **14** (7), 599-624.

Rekha, K. *et al.* (2000) Biosensors for the detection of organophosphorus pesticides. *Crit. Rev. Biotechnol.* **20** (3), 213-235.

Rich, R. & Myszka, D. (2000) Survey of 1999 surface plasmon resonance biosensor literature. *J. Mol. Recog.* **13** (6), 388-407.

Scheller, F. *et al.* (2001) Research and development in biosensors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12** (1), 35-40.

Vo-Dinh, T. & Cullun, B. (2000) Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J. Anal. Chem.* **366** (6-7), 540-551.

(侯利华　译　　苏国富　校)

第10章

工业酶概述

10.1 工 业 酶

前几章主要介绍了蛋白质在治疗诊断或分析中的应用，这些蛋白质一般产量小，纯度高，且作为医疗保健产品一般较贵，因此经济因素在生产和销售中并不重要。本章（及以后的两章）将探讨一组不同的蛋白质，即工业酶或称批量酶，这类酶包括淀粉酶、纤维素酶、木质纤维素降解酶、果胶酶、蛋白酶、脂肪酶、肌醇六磷酸酶、青霉素酰基转移酶和环糊精糖基转移酶。这些酶的大部分为水解去聚合酶，与用于治疗和诊断的酶不同，工业酶一般产量很大，每年有上千甚至上万千克的产量，并且一般只加工到一定程度。此外，多数情况下，经济因素如生产成本在商业运作中起很重要的作用（表 10.1）。

表 10.1 工业酶与医疗保健用蛋白的比较

工 业 酶	医疗保健用蛋白
生产量大	生产量小
部分酶纯化程度高	纯化程度均高
经济是重要因素	经济因素居第二位，产品功能是最重要的
功能是催化	功能众多，如激素、生长因子、细胞分裂素、调节因子、血液因子、疫苗、抗体、酶
多数来源于微生物和重组产品	多数来源于人和动物及重组产品
多数是胞外产物	胞内或胞外产物

工业酶被应用在很多生物技术过程中，像酿造、制酒、奶酪生产等很多技术有着很久远的历史，在这些制造过程中，人们不自觉地应用微生物作为所需酶的来源，用来将底物转化为酒精、奶酪等最终产品。对这些过程分子水平的深入理解，推动了之后在特定工业过程纯化酶的应用。

制备的酶普遍被应用于酿造、面包制作、淀粉加工和奶酪制造工业（表 10.2）。这些酶的应用也推动了许多其他生物技术过程，这些过程能生产更广泛的重要工业产品，如酶也应用于生产甜味品，改进食品的味道、纹理和外观，应用于肉品嫩化，啤酒、葡萄酒、果汁澄清及清洁剂制备。图 10.1 概括了工业酶的主要工业应用。

表 10.2　一些重要的工业酶的传统来源与工业应用

酶	传统来源	样品应用
α-淀粉酶	*Bacillus amylolique faciens* *Bacillus licheni formis* *Bacillus subtilis* *Aspergillus oryzae*	水解淀粉的 α-1-4-链，用于液化及减小淀粉黏性
β-淀粉酶	*Bacillus polymyxa* *Bacillus circulans* 大麦	酶解淀粉生成麦芽糖
葡萄糖淀粉酶	*Aspergillus niger* *Rhizopus* spp.	水解淀粉生成葡萄糖
麦芽糖酶	*Bacillus* spp. *Aerobacter aerogenes* *Klebsiella* spp.	通过水解 α-1-6-糖苷键解链淀粉
葡萄糖异构酶	*Bacillus coagulans* *Bacillus stearothermophilus* *Streptomyces* spp. *Arthrobacter*	通过转化葡萄糖为果糖生产高果糖的糖浆
β-乳糖酶	*Bacillus coagulans* *Streptomyces* spp. *Saccharomyces* spp. *Aspergillus* spp.	水解乳糖生产葡萄糖和半乳糖
蔗糖酶	*Saccharomyces* spp.	水解蔗糖生产葡萄糖和果糖
纤维素酶、半纤维素酶	*Trichoderma* spp. *Sporotrichum cellulophilum* *Actinomyces* spp. *Aromonas* spp. *Aspergillus niger*	酶解含纤维素的物质
果胶酶	*Aspergillus niger* *Fusarium* spp.	酶解胶质
蛋白酶	多种菌属 *Bacillus amylolique faciens* *Bacillus subtilis* *Streptomyces* spp. *Aspergillus oryzae* 由动物获得如小牛胃	酶解蛋白，广泛用于清洁剂和酿造、面包制作和肉制品嫩化等过程
脂肪酶	*Mucor* spp. *Myriococcum* spp. 动物胰腺	酶解脂肪，用于奶制品工业改善气味，也用于制造清洁剂

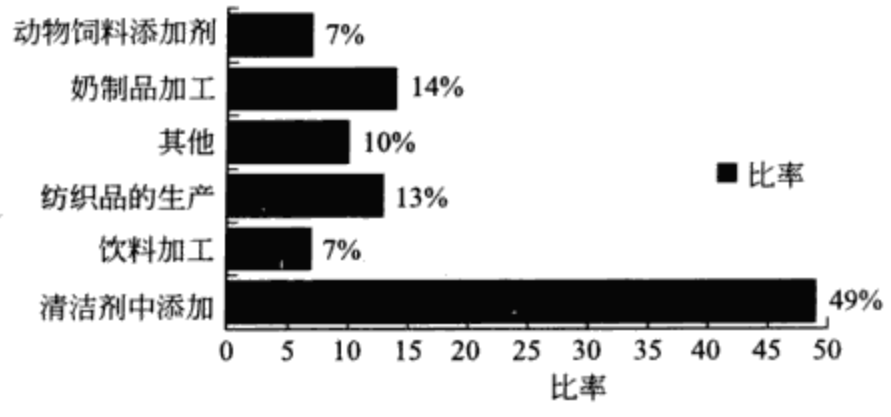


图 10.1　使用工业酶的主要产品与工艺以及这些酶在总酶市场中占有的份额

其他包括淀粉加工（4%）、面包/糖果工业（5%）、皮革软化/加工（1%）。复制（已修改）自：Rehm，et al（1999），Biotechnology a Multi Volume Comprehensive Treatise，Vol. 5a，191，Wiley-VCH，Weinheim

10.1.1　工业酶的商业价值

到 20 世纪 90 年代末，世界工业酶年产值达 15 亿美元，约为 80 年代末的两倍，蛋白酶约占市场份额的 50%，糖降解酶占余下的大部分（表 10.3）。酶销售持续增长的原因可能有两个（图 10.2），一是经济因素，如世界经济的增长；另外是先进技术的应用，如基因工程对酶生产的影响，新酶应用技术的开发。当新型工业酶如肌醇六磷酸酶和环糊精糖基转移酶（其他见表 10.3）的综合销量不错时，它们的市场价值在随后几年将直线上升。主要的工业酶生产厂商列于表 10.4，Novo Nordisk 是世界酶制剂的最大供应商，它有约 600 种不同酶制剂，可用于清洁剂、动物饲料、酒精、葡萄酒、酿造、烘焙、果汁、皮革、纸浆、造纸、食品和纺织工业。

表 10.3　工业酶全球年销售额

酶	销售额/百万美元
蛋白酶	700
纤维素酶	180
α-淀粉酶	135
脂肪酶	90
半纤维素酶	75
葡萄糖糖化酶	60
果胶酶	60
乳糖酶	15
葡萄糖异构酶	15
麦芽糖酶	15
其他	100

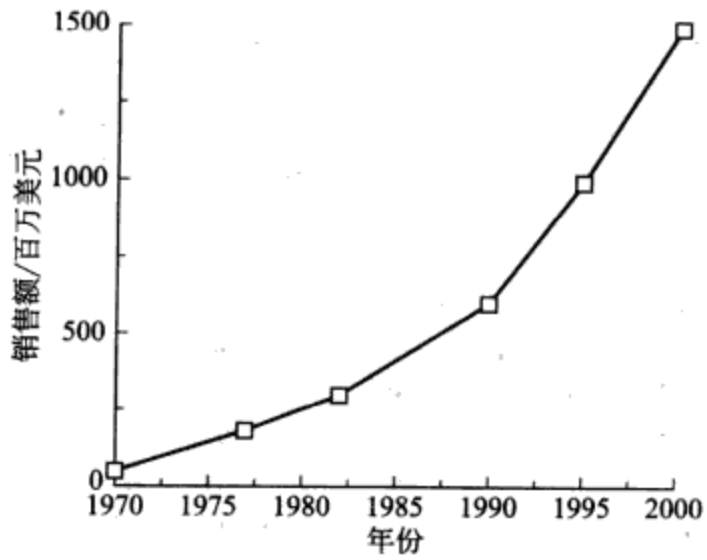


图 10.2　全球工业酶市场销售走势
依全球年销售额估计，1970～2000 年，由多种资料汇总而成

表 10.4　主要工业酶生产厂家和网页地址

公　司	网 页 地 址
Novo Nordisk(丹麦)	http://www.novo.dk
Gist-Brocades(荷兰)(part of the DSM group, the Netherlands)	http://www.dsm.nl/
Genencor Int.(美国)	http://www.genencor.com/gciinternet.nsf
Solvay(比利时)	Industrial enzyme business sold to Genencor
Danisco Cultor(芬兰)	http://www.cultor.fi

10.1.2　工业酶传统（非重组）来源

大部分工业酶来源于微生物，生产菌株是一般公认安全（GRAS）的微生物家族的成员，这种工业酶主要由细菌或真菌生产，绝大部分属于杆菌、曲霉菌属（表 10.2）。

杆菌类作为重要工业酶的传统来源有很多原因：

① 除去蜡状芽孢杆菌，它们都是安全无害的，并且在自然界中分布广泛；

② 它们易在相对便宜的培养基中培养；

③ 杆菌属能大量生产所需的酶，且大部分可分泌到胞外的发酵液中，胞外酶极大简化了随后的产品回收和纯化过程（见第 3 章）。

各种各样的曲霉菌属由于显示出优于杆菌的特性也用于酶的生产。少数重要工业酶也可由酵母生产得到。

可选的用于生产的微生物一般需经过初步的筛选。很多野生菌通过这样的方法被筛选出来，刚开始目的酶产量可能较小，在传统上，可用优化菌株的方法提高产量，例如突变后进行高产菌株筛选（第 2 章）。

10.1.3 基因工程对酶生产的影响

基因工程对工业酶生产一直都有较大影响，从 20 世纪 80 年代以来，主要的酶生产厂商开始建立由重组方法生产特定工业酶的研究计划。第一个应用于生产的重组产品出现于 20 世纪 80 年代后期，现在，大部分工业酶是由重组技术生产出来的。重组生产战略不仅使用同源表达系统，也应用异源表达系统（第 2 章）。表 10.5 列出了一些商业化了的重组工业酶的例子。

表 10.5 一些由 DNA 重组技术生产的酶

产品名称	种类	用途	厂商	原始基因来源	表达宿主
Maxiren	凝乳酶	奶酪制造	Gist-Brocades	小牛胃细胞	*Kluveromyces lactis*
Optiren	蛋白酶	奶酪制造	Gist-Brocades	*Rhizopus miehei*	*Aspergillus oryzae*
Natuphos	肌醇六磷酸酶	动物饲料添加剂	Gist-Brocades	*Aspergillus niger*	*Aspergillus niger*
Lipolase	脂肪酶	清洁剂的添加剂	Novo Nordisk	*Humicola languinosa*	*Aspergillus oryzae*
Lipomax	脂肪酶	清洁剂的添加剂	Gist-Brocades	*Pseudomonas alcaligenes*	*Pseudomonas alcaligenes*
Lumafast	脂肪酶	清洁剂的添加剂	Genencor	*Pseudomonas mendocina*	*Bacillus* sp.
Duramyl	淀粉酶	清洁剂的添加剂	Novo Nordisk	*Bacillus licheni formis*	*Bacillus* sp.
Purafect OxAm	淀粉酶	清洁剂的添加剂	Genencor	*Bacillus licheni formis*	未列出
Carezyme	纤维素酶	清洁剂的添加剂	Novo Nordisk	*Humicola insolens*	*Aspergillus oryzae*

重组方法生产工业酶比传统（非重组）法显示了很多潜在优势，这些优势包括：

① 可得到较高表达；

② 生产一般显示较高的纯化水平；

③ 成本低；

④ 异源表达有利于由易致病菌/非安全菌生产酶的商业化；

⑤ 可用蛋白质工程改变酶的性质。

增强启动子可使目的基因多拷贝，可以得到重组产物的高表达（第 2 章）。表达水平一般达细胞总蛋白的 10%～30%，也曾有报道表达水平能达到 50%。重组产物总是微生物的胞外分泌物。目的酶的高水平重组产物在技术和经济方面有许多显而易见的优势，包括：

① 批式发酵的规模可以充分增大，从而减少上游和下游生产成本；

② 缩减生产体积可以减少废物和副产物的量，从而能减少成本，对环境也友好；

③ 高表达水平可减少杂蛋白：目标蛋白处于发酵培养基中，可得到初始纯度较高的产品。

表 10.6 概括了重组法与非重组法生产 α-半乳糖苷酶的比较，可以说明以上特点。

表 10.6　重组法（面包酵母）和非重组法生产 α-半乳糖苷酶[①]分离过程的比较

分离提取阶段	面包酵母	重组酵母
纯化工序	10	4
生物量/t	236	10
酶活力/kU·g^{-1}	0.4	11
酵母细胞碎片/t	440	12
硫酸铵/t	1100	25
磷酸钾/t	25	0.5
氧化铝吸收剂/t	90	0
过滤设备/t	133	5
水/m^3	3700	50
电/kW·h	45000	9000

① 原文为 α-glucosidase，可能有误——译者注。

注：经许可引自 Kopetzki et al (1994)，Clinical Chemistry，40，688～704。

高表达水平也使在自然条件下由致病及特殊微生物表达水平较低的酶，难培养或培养成本较高微生物所产的酶达到工业生产规模，成为商业产品。例如，原来由嗜热厌氧菌（Thermoanaerobacter）在自然条件下生产环糊精糖基转换酶（第 12 章），现在由 Novo Nordisk 公司经浸麻芽孢杆菌（Bacillus macerans）生产，达到商业化水平（表 10.5）。重组 DNA 技术也明显促进了非微生物产酶工业化规模的扩大。例如，凝乳酶可在各种各样的微生物体系中重组生产（表 10.5）。

10.1.4　工程酶

重组 DNA 技术使人们可以按照预先的设计来改造酶的氨基酸顺序。蛋白质工程（第 1 章）可以改造一般的酶使其适合特定的工业用途。因此已商业化的主要产品是那些增加了抗氧化性，进而提高了其在漂白剂中的稳定性和功效的酶（表 10.7）。这些在以后的几章将会更详尽地讨论。此外蛋白质工程对酶工业还有其他意义，包括提高淀粉制造过程中淀粉酶的热稳定性（第 11 章），使蛋白酶具有更广泛的底物选择性（清洁剂用），提高酶在表面活性剂存在时的稳定性（清洁剂用）等。

表 10.7　用定点突变改变氨基酸序列，提高抗氧化性，扩大工业用途的清洁剂用酶

酶（商品名）	厂　商	说　明
Purafect 0x Am	Genencor Int.	抗氧化 α-淀粉酶
Duramyl	Novo Nordisk	抗氧化 α-淀粉酶
Lipomax	Gist-Brocades	抗氧化脂肪酶
Lipolase ultra	Novo Nordisk	抗氧化脂肪酶
Maxapem	Gist-Brocades	抗氧化蛋白酶
Everlase	Novo Nordisk	抗氧化蛋白酶

10.2　固定化酶

大量应用在工业加工过程的酶在完成催化反应后未回收。然而以固定化酶形式存在的有些酶可以在催化反应后回收，从而促进了酶制备时的重复利用，具有很显著的经济利益。在

一定情况下使用固定化酶还是游离酶取决于经济、技术和实际情况。制备酶费用越高，越倾向于使用固定化酶。当然同时要保证固定化不能对酶的稳定性、反应动力学和其他特性产生不良影响。很多情况下（比如用于治疗的酶或使用大量粗酶的工艺过程），回收固定化酶是不实际的。一些著名的应用固定化酶的工业过程列于表 10.8。酶的固定化方法有很多，包括将酶包埋在特定基质中，或键合在不溶的基质上（图 10.3）。

表 10.8　一些固定化工业酶的应用及所催化的反应

酶	应　用	催 化 反 应
葡萄糖异构酶	生产高果糖的玉米浆	将葡萄糖转化为果糖
氨基酸酰基转移酶	生产氨基酸	L-乙酰氨基酸脱乙酰基
青霉素酰基转移酶	生产半合成的青霉素	将天然生产的青霉素侧链转移，生成 6-氨基青霉酸
乳糖酶	乳酸水解	水解乳糖生成葡萄糖和半乳糖

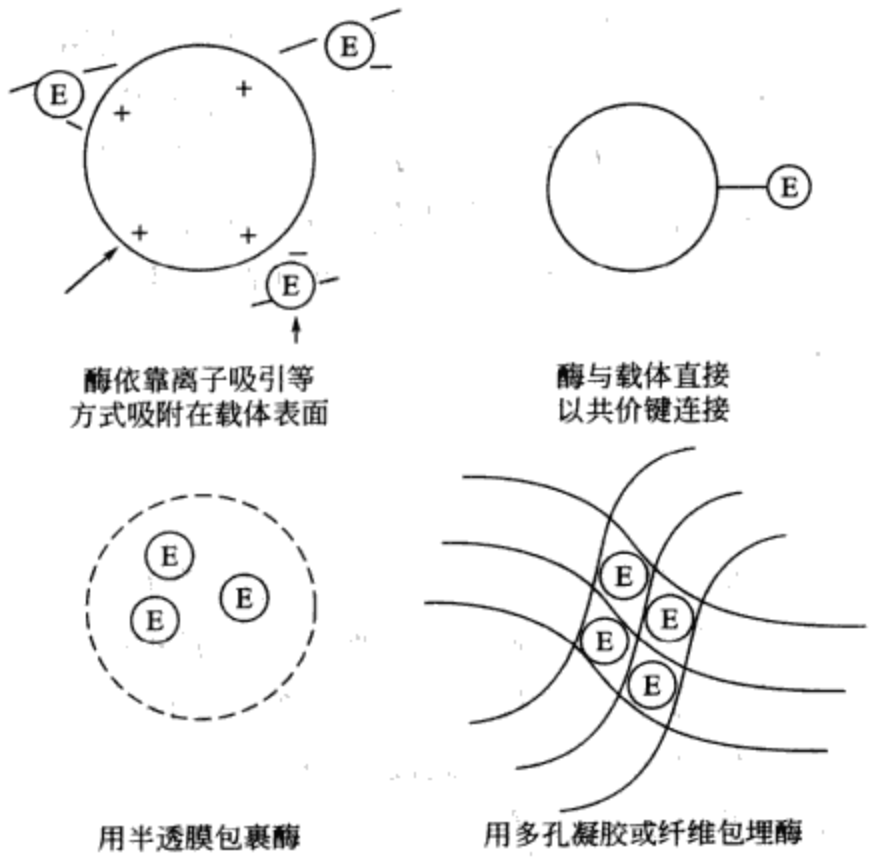


图 10.3　酶固定化的常用方法

10.2.1　凝胶包埋

酶可以包埋在聚合的凝胶基质内，将酶与凝胶单体混合后再使凝胶聚合即得。将酶包埋在聚丙烯酰胺或聚甲基丙烯酸酯凝胶就是两个例子。为了取得较好的固定化效果，凝胶的空隙一般要足够小到能将酶包埋，但也要大到足够使底物和产物能够自由通过。酶也可以包埋在工业纤维像醋酸纤维形成的分子大小的空隙中。

包胶（encapsulation）是将酶包埋在球状半透膜内。小分子，如酶作用底物、辅助因子和产物，必须能自由通过膜，而酶或其他大分子不通过膜。硝酸纤维素膜和酰胺纤维膜都较为适用。

10.2.2　吸附

酶也可以通过结合到不溶的基质上进行固定，现在已经开发了许多吸附的方法和基质，最简单的可能是将酶物理吸附到合适的载体上，通过将酶和载体混合，在适当条件下（离子强度、pH 值、温度等）反应达到最佳吸附。这些相关参数一般由经验确定。由于酶和介质表面的吸附力很弱，因此酶从载体上脱落是一个常见的问题。氢氧化铝经常用于吸附法固定化酶，许多酶都是通过这种方法进行固定的。

酶也可以通过与带电基质离子的相互作用进行吸附。离子交换树脂，如 DEAE-纤维素、DEAE-交联葡聚糖，可用于带负电酶的固定化；而如 CM-纤维素这样的阳离子交换树脂可用于带正电酶的固定化。这种固定化方法技术简单，经济合算，在适当条件下酶的脱落问题在操作柱中并不明显。这种固定化系统可通过可溶酶的溶液流过再生。

最著名的用 DEAE-交联葡聚糖固定化的工业规模酶也许是用于合成生产 L-氨基酸的酰化氨基酸水解酶。葡萄糖异构酶也可以用此方法进行固定，但是葡萄糖异构酶是胞内酶，一般用戊二醛交联微生物死细胞（细胞碎片）然后成球来制备（表 10.9）。制备时球状细胞灌注在反应柱中，然后葡萄糖浆液从柱中流过并进行反应。这一过程的主要缺点是固定化系统的机械稳定性相对不够。大约 1500t 的固定化葡萄糖异构酶每年可以生产 700 多万吨高价果糖浆液（第 11 章）。

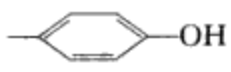
表 10.9　采用交联破碎或完整细胞制备固定化葡萄糖异构酶（呈现胞内葡萄糖异构酶活力）

厂　商	国　家	固定化方法
Novo Nordisk	丹麦	*Bacillus coagulans* 细胞，匀浆，与戊二醛(GA)交联，挤压
Gist-Brocades	荷兰	*Actinoplanes missouriensis* 细胞与凝胶混合，与 GA 交联
Miles Labs	美国	*Streptomyces olivaceus* 细胞与聚胺和 GA 交联，挤压
ICI	英国	*Arthrobacter globiformis* 细胞与阳离子和阴离子聚合
Nagase	日本	*Streptomyces phaechromogenes* 酶，GA 与完整死细胞交联

较常用的酶固定化方法还有酶和适当不溶载体间的共价交联，共价交联在技术上比其他的固定化方法都复杂，并且需要许多昂贵的化学试剂而且耗时。但是共价交联的固定化酶是非常稳定的，酶在柱子中的泄漏最小。

许多不同的共价交联固定化方法已经发展起来了。所有的方法都在一个特定的不溶载体表面活性基团和一个蛋白质的表面特定基团之间形成了共价键，而后者（蛋白质的表面特定基团）在酶催化反应中不应该是必需的。羟基（糖基基质中，如纤维素、葡聚糖、琼脂糖）常参与形成共价键。许多氨基酸中存在的氨基、羧基及巯基也可形成共价键（表 10.10）。图 10.4 列出了典型的固定化酶化学键形成过程。

表 10.10　包括形成共价键时作用基团的一些氨基酸残基

氨　基　酸	功　能　基　团
赖氨酸	$-NH_2$
精氨酸	$-NH_2$
酪氨酸	
天冬氨酸	—COOH
谷氨酸	—COOH
半胱氨酸	—SH
甲硫氨酸	$-S-CH_3$

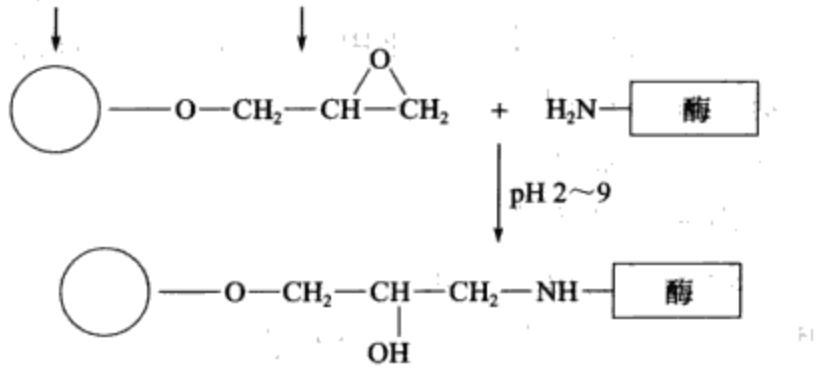


图 10.4　酶与含活性环氧基团的固相载体的共价交联

交联反应中参与最多的酶的氨基来自酶表面的赖氨酸残基

10.2.3　酶的安全性

20 世纪 60 年代，蛋白水解酶在清洁剂的制造中有广泛的应用（第 11 章），这是由于这一时期在世界范围内蛋白酶销售大量增长造成的。然而，到 20 世纪 60 年代末，酶加入到清洁剂中引起很大的争议。那时，粗蛋白酶产品被干燥，粉碎成粉末，使用这些粉末时（酶和清洁剂的制造工厂以及终端用户）常会导致大量粉尘的形成。吸入含酶的粉尘后，酶的微生物（外源）特性可导致易感人群的过敏反应。

到 20 世纪 70 年代初，多数清洁剂的生产就已经不添加酶了，然而，围绕清洁剂中含有酶是否安全仍然存在很大的争论，后来争论甚至扩展到工业酶尤其是食品工业酶的应用安全

性上。但是，科学随后证明，工业用酶从本质上讲是安全的。微生物、植物和动物酶已经被人类在无意中应用了几千年，期间未显示出毒性。从人们的日常饮食中得到的具有催化活性的酶无致病性，且作为蛋白酶还可被人体当作营养物吸收。工业用的微生物酶是从安全无害的生物体内得到的，因此，对人体健康没有危害。除此以外，用于生产的微生物发酵培养基成分必须无毒，产品生产的下游过程所用的化合物也应是无害的。同样，由植物或动物体得到的酶也应从可食用、无毒的物种中提取。有时在食品和饮料生产过程中应用的是固定化酶（所以酶不会存在于最终产品里）。在另一些情况下，酶在食品生产过程中发挥效用后，会在后来的加工过程中失活或被破坏。

鉴于酶操作安全性的要求，成粒技术的不断发展，干燥酶制备过程中粉尘的形成可以降到最小程度（第 3 章）。然而，在实际工业生产过程中仍要求工人在进行酶制备操作时（尤其预成粒阶段）穿安全服，在含酶的粉尘环境内必须配备呼吸过滤器，生产车间通风系统必须能将粉尘滤除，防止粉尘再流通。

近来，重组工业酶的出现又引起了更多争议。迄今为止，大多数重组酶都是加入到清洁剂中（表 10.5），但有些（如凝乳酶）是应用在食品工业中。同样的，重组酶也是由安全无害的生物体生产的，因此具有同非重组酶一样的安全性。

10.2.4 工业酶前景

工业酶产品的种类和市场价值在以后将会有较大的增长，传统生物技术研究将继续从各种来源找出新的工业酶。最近发现在极端环境中生长的微生物能提供大量新的、具有潜在应用前景的酶。快速筛选技术和基因工程，生物信息学也推进了具有工业意义的新酶的鉴定。基因工程的出现使得工业用的任何酶都能够经济、大规模地生产。此外对蛋白质结构与功能关系的深入认识，使得可以通过蛋白质工程定向改造出最适于工业生产的酶。虽然任何基因工程酶的商业化生产都受到严格的调节控制，然而，人们最终会逐渐接受这些产品，就像清洁剂用酶未被大众反对一样，应用于食品中的工程酶也在逐渐被人们接受，如重组凝乳酶已获得较广泛的市场认可。此外，重组酶产品在有些国家（如美国）能够得到较快认可，但在其他一些地区（如欧洲）则不然。

最近工业酶研究的一个方向是酶在非水相溶液中的应用，这可使酶催化不溶于水或微溶于水、易溶于有机溶剂的底物的生物转化反应得到发展。

10.3 极 端 菌

至今为止，大多数工业用微生物酶都是由嗜温菌生产的（如曲霉菌），除了一两个工业过程外，它们的操作温度都在 35～60℃，pH 值在 4～8 之间。极端菌的发现为寻找能在此有限范围外发挥作用的工业酶提供了潜在来源。

极端菌是具有一个或几个极端参数（温度、pH 值、离子强度、压力）的生态环境下生长良好的微生物。表 10.11 概括了极端菌的分类。有些极端菌能在两个或多个极端环境参数下生长，例如嗜热好酸菌，能在 pH 值低于 2 且温度高于 75℃的环境中生长。一些耐压菌能在温度低于 2℃，同时压力高达 1200×10^5 Pa 的环境中生长。

表 10.11　各种极端菌及其生长环境

极端菌类型	自然生长环境	相关生长参数	典型微生物
嗜热菌	地热环境(如温泉)	最适生长温度在 80℃以上	*Pyrococcus furiosus*
耐盐菌	高盐水中	在浓度高达 5mol/L NaCl 下生长	*Halobacterium halobium*
低温菌	极冷环境(如南极海水)	在低达－2℃的环境中生长	*Alteromonas* sp.
耐碱菌	碱性环境	在 pH9 以上的环境中生长	*Natronobacterium* sp.
耐酸菌	酸性环境	在 pH4 以下的环境中生长	*Thermoplasma acidophilum*

10.3.1　嗜热菌

嗜热菌是能在高温环境下生长的微生物。不同的生命形式能在不同的温度范围内生长，而生命存在的环境最高温度一直是生物学中人们感兴趣（但仍未知）的一个问题。鱼类和其他水生生物生长（通常是存活）的最高温度大约在 38℃，多数植物和昆虫生长的最高温度大约在 50℃，真核微生物（原生动物、藻类和真菌类）生长的最高温度大约在 60℃，原核微生物（蓝藻，光合细菌）能在 70～73℃下生长。科学家们一直以来都在研究热稳定的微生物如何在高温下进行生命活动，此外科学家们还从这种微生物中找到了具有热稳定性的生物分子，它们可应用于很多工业过程（应用于重组 DNA 技术的热稳定的 DNA 聚合酶、添加热稳定蛋白酶的生物清洁剂等）。

随着 20 世纪 80 年代人们发现了能在 100℃或高于 100℃下生长的微生物以来，在这一领域的理论和应用研究就有了革命性的进展。现在知道这样的微生物大约有 20 种（表 10.12）。

表 10.12　（极端）嗜热古细菌及其最高生长温度

类　别	种属(最高生长温度)	
热球菌	*Pyrococcus*	(105℃)
	Thermococcus	(97℃)
叶状硫细菌	*Sulfolobus*	(87℃)
	Acidianus	(96℃)
	Desulfurolobus	(87℃)
	Metallosphaera	(80℃)
	Styoiolobus	(88℃)
热变菌	*Pyrodictium*	(110℃)
	Thermodiscus	(98℃)
	Desulfurococcus	(90℃)
	Staphylothermus	(98℃)
	Thermoproteus	(92℃)
	Pyrobaculum	(102℃)
	Thermofilum	(100℃)
热原生质体	*Thermoplasma*	(67℃)
产甲烷类古细菌	*Methanothermus*	(97℃)
	Methanococcus	(91℃)
	Methanopyrus	(110℃)
硫酸盐还原类古细菌	*Archaeoglobus*	(95℃)
未分类	*Hyperthermus*	(110℃)
	ES-1	(91℃)
	ES-4	(108℃)
	GE-5	(102℃)
	GB-D	(103℃)

迄今为止发现的嗜热微生物都是从地热环境中分离的，这样的环境在世界上分布广泛，且和地球地壳运动、地质板块活动有关。地壳运动及板块活动活跃的地区，岩浆离地表很近，可作为地下水或海水的热源，产生深海热流、温泉或间歇泉，这些都是嗜热菌的潜在来源。

尽管有些嗜热菌是好氧的，但多数是严格厌氧，利用混合的肽作为能源、碳源和氮源异养生长。大多数主要依靠还原硫元素为硫化氢来生长，少数菌利用糖类生长。这些菌培养时一般需要特殊的发酵设备和特别的驯化环境。

考虑到嗜热菌生长的特殊环境，不难想到它们的细胞结构和代谢可能与众不同。研究表明，古细菌和嗜温菌的细胞质膜在结构上完全不同，例如，它膜上的脂类基本不含有脂肪酸酯。从这些嗜热菌中提取的蛋白质都有较好的热稳定性，有些在高达 140℃的温度时还保持生物活性。

10.3.2 由嗜热菌生产的酶

从嗜热菌中已经分离出大量的具有很强热稳定性的酶（表 10.13），从而推动了旨在鉴定高温工业酶的深入研究。这些酶能满足下列工业过程中的高温操作：

① 减少流动过程的黏度（如淀粉水解过程）；

② 防止微生物的生长（在食品中的重要应用）；

③ 使得很多反应底物更好地溶解/更容易水解。

表 10.13 一些从各种嗜热菌中提取的酶的最适温度（T_{opt}）和热稳定性

酶	来 源	T_{opt}	热稳定性/t_{50}
蛋白酶	*Thermobacteroides vulgaris*	85℃	无记录
蛋白酶	*Pyrococcus furiosus*	>115℃	98℃时为 33h
DNA 聚合酶	*Pyrococcus furiosus*	>75℃	95℃时为 20h
淀粉酶	*Pyrococcus woesei*	100℃	100℃时为 6h
淀粉酶	*Pyroccus furiosus*	100℃	120℃时为 2h
淀粉麦芽糖酶	*Thermoproteus tenax*	118℃	98℃时为 20h
木聚糖酶	*Thermotoga* sp	105℃	95℃时为 1.5h
纤维二糖水解酶	*Thermotoga* sp	105℃	108℃时为 1h
葡萄糖异构酶	*Thermotoga neapolitana*	95℃	无记录
α-葡萄糖苷酶	*Pyrococcus furiosus*	100℃	98℃时为 48h
β-葡萄糖苷酶	*Pyrococcus furiosus*	105℃	100℃时为 85h 或 110℃时为 13h
谷氨酸脱氢酶	*Pyrococcus furiosus*	95℃	100℃时为 10h
乳酸脱氢酶	*Thermotoga maritima*	>90℃	90℃时为 1.5h

注：这些酶大多数具有工业应用潜能。t_{50}表示一定温度下催化活力减少 50%所需要的时间。

此外，耐热酶能抵抗其他一些变性因素导致的失活，如清洁剂、有机溶剂、氧化剂。研究表明，有时耐热酶也能抵抗蛋白酶解。但是由嗜热菌分离出的酶也并不适合所有工业过程，因为：

① 有些过程并不需要高温操作（如热敏的反应物/产品）；

② 由于能耗低，低温操作更经济；

③ 有时商品（如清洁剂）倾向于低温操作；

④ 升温操作没有明显优势；

⑤ 已经使用了足够的耐热酶；

⑥ 某些食品中应用（面包制作时淀粉酶的应用）时，加入酶起到催化作用后，须加热失活——对极端耐热酶进行热失活是不切实际的；

⑦ 源于厌氧古细菌的酶是氧敏感型的，不适合应用于工业过程。

很多嗜热菌都很难培养，大多数是严格厌氧的，且培养的最终细胞密度很低，很多代谢终产物有毒且/或具腐蚀性（如很多厌氧菌产出 H_2S）。因此，工业中大规模的生产嗜热菌酶要依靠 DNA 重组技术。图 10.5 列出了古细菌生产有潜在应用价值的酶的全部方法。7 种极端菌的全部基因序列在世纪之交时已经或基本被确定。对比分析这些序列（与编码常温酶的基因序列）能有效快速地鉴定工业用热稳定酶。

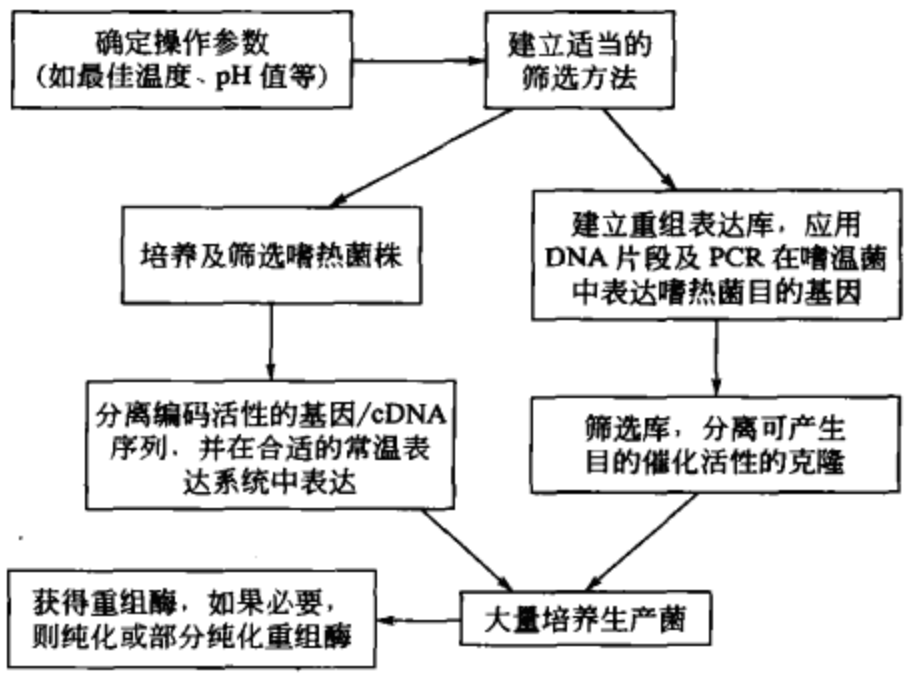


图 10.5　鉴定和生产具有潜在工业应用价值的嗜热菌酶的方法总览

在常温工程菌中表达的重组热稳定酶的部分纯化过程有时可使用简单加热的方法，加热（如 80℃下保持几分钟）会使常温菌大部分蛋白质失活或沉淀，而重组蛋白不会受影响

至今为止，唯一商业化的高温酶是热稳定的 DNA 聚合酶（第 12 章）。进一步的研究应集中在：①鉴定适合这些热稳定酶应用的工业过程或适合高温过程的酶；②鉴定能用于新酶介导的生物技术过程的新古细菌酶。

10.3.3　其他极端菌生产的酶

虽然至今为止，基于极端菌的研究大部分集中于超嗜热菌，然而，其他极端菌的生物化学和生物技术应用潜力也已得到高度重视。低温菌的研究现在多集中于南极水域的鱼上，它能持续暴露在－1.8℃下（海水的冰点）。这些鱼的体液中含有抗冻糖蛋白，该蛋白有抑制冰晶生长的功能。从这些体液中或其他嗜寒菌（如南极微生物）中提取的酶能在接近 0℃下发挥最大酶活力，部分酶在 6～10℃下不表现催化活力或催化活力不提高，而有些在温度高达 45℃时还保持催化活力。

认识这些酶的克隆、DNA 序列及三维结构，有助于科学家弄清它们在如此极端的环境下发挥作用的分子水平的适应性（第 1 章）。然而，至今适应寒冷环境的酶在生物技术上还没有实际的应用，一些具有潜在应用的领域已经被提出，包括：

① 应用在热不稳定的底物及/或产品的生物转化反应或过程中；

② 应用在低温食品过程，抑制微生物生长；

③ 应用在低温操作的工业过程，由于能量需求减少，生产成本减少。

这些应用仍然有待于被证明其商业上的可行性。

一些从嗜盐微生物中提取的蛋白质也吸引着生物技术人员的兴趣。嗜盐微生物（尤其是嗜盐古生菌）生产的胞内酶和胞外酶均是极度嗜盐或耐盐的，这些酶的大部分都具有很强的

稳定性，对诸如提高温度等变性因素具有抵制作用。稳定性是任何工业酶都十分需要的特性。嗜盐酶较为理想的应用领域大概是在有机溶剂中的生物转化反应。在低水活度的环境下，一些溶剂易使蛋白质的必需水化层断开，从而使酶丧失活性。而嗜盐酶在很低水活度下仍能保持活性。

一些嗜盐菌的质膜上含有“紫丁”(purple patch)。紫丁是一个含视网醛的跨膜蛋白，主要由紫膜质组成，紫膜质由一些不连续的 α 螺旋组成，每一个 α 螺旋含有约 20 个疏水氨基酸，而这些蛋白质嵌于质膜上。紫膜质在嗜盐菌中发挥拟光合作用的功能，它（或者说其辅基）能吸收光子，使激发态分子转变为稳定态，诱导蛋白质构型变化，构型变化的蛋白质可以使质子在质膜内外泵进泵出。由此可把质子从细胞内排出。跨膜的质子梯度就建立起来了，当质子通过运输机制重新进入细胞时释放能量，用于将 ADP 和 Pi 合成 ATP。

紫膜质，即光驱动质子泵是一种稳定的蛋白质，它可以装填于聚合物中或固定在固体表面而不失活。紫膜质分子位于膜合成系统，它的活力可保持一年甚至更长时间。紫膜质参与的光化学反应是一个自再生系统，它生成的光电信号是可再生的。因此这个蛋白质在生物电子学领域可用作光控元件，已引起了人们的关注。

10.3.4 有机溶剂中催化反应的酶

即使在几年前，人们还认为酶加入到有机溶剂中（如苯、丙酮、甲苯、环己烷等）会失活和变性。蛋白质在水中能发挥作用，疏水作用使蛋白质折叠，进而其保持生物活性结构。这说明非极性氨基酸残基包裹在蛋白质的疏水核心内，而极性氨基酸位于蛋白质的表面，与周围水分子结合（第 1 章）。

将酶加入到非极性的有机溶剂内应该会使蛋白质内翻，但事实上，许多酶（以冻干的形式）加入到某些有机溶剂中，虽然是少水或无水系统，但仍保持催化活性。这可能因为这些溶剂的介电常数远远低于水的介电常数，较低的介电常数能加强蛋白质中的静电力，由此增强其稳定性。非极性溶液环境也可以增强分子间的氢键作用。

酶在有机溶剂中仍保持活性引起了生物技术人员的兴趣，有机溶剂中用酶在特定生物技术应用中的潜在优势为：①增加非极性底物/产物的溶解性；②增加酶的热稳定性；③改变酶与底物结合特性；④改变热力学平衡，使之有利于合成，不利于分解（如蛋白酶作用于肽链）；⑤易通过过滤或离心回收，有利于酶重复使用；⑥使用低沸点溶剂，有利于通过蒸发回收产物；⑦多数有机溶剂抑制微生物生长。主要优势之一是严格不溶于水的脂溶性底物，能溶于有机溶剂中，这促进了酶在非极性底物的转化反应中的应用。酶在有机溶剂中还显示出了在水溶性溶液中没有的热稳定性（表 10.14），虽然热稳定性增强的原因还不完全清楚，但这可能是由于前面所说的酶分子间的静电作用造成的。由于酶不溶于多数有机溶剂，它们加入到有机溶剂中后一般以悬浮的形式存在，而非溶解的形式，酶就可以通过过滤或离心的方法回收（重复使用）。

酶加入到有机溶剂中后对底物的专一性通常会改变，动力学参数如 K_{cat} 和 K_m 一般也会改变。有时反应方程式也会逆转（如枯草杆菌蛋白酶能催化肽键的合成而不是水解）。酶和底物的结合受溶剂影响可以解释这些变化。酶和底物的结合能是由酶-底物复合体的能量与酶、底物的自由能（分别与溶剂分子发生作用的能量）之差决定的。酶的天然立体选择性在

表 10.14　非水和水介质中酶热稳定性比较

酶	溶　剂	一定温度下活力减少一半的时间
猪胰脂肪酶	水(缓冲液)	<1min(100℃)
	有机溶剂(三丁酸甘油酯)	12h(100℃)
溶菌酶	水(缓冲液)	8min(100℃)
	有机溶剂(环己烷)	140h(100℃)
胰凝乳蛋白酶	水(缓冲液)	<1min(100℃)
	有机溶剂(辛烷)	270min(100℃)
核糖核酸酶	水(缓冲液)	<10min(90℃)
	有机溶剂(壬烷)	>6h(110℃)

有机溶剂中也会改变，如枯草杆菌蛋白酶在有机溶剂中能将 D 型氨基酸，也能将 L 型氨基酸合成肽类。

有机溶剂中酶在工业中应用不广泛的一个障碍是多数酶在有机溶剂中活力较低。虽然有时活力降低相对不大，但是，大多都会降低 10^4～10^7 倍，这使得该酶在工业过程中并不经济实用。酶置于有机溶剂中活力降低的原因有很多，酶以悬浮状态存在时，比以溶液状态存在时增大了接近底物的扩散限制。酶在有机溶剂中其结构可能改变，使得催化效率降低。此外，酶在水中时，pH 值是影响其活性的一个重要因素，但在有机溶液中，pH 值的影响并不大。尽管有一定难度，但是越来越多的研究和开发工作旨在使有机溶剂中的酶用于许多目的，特别是有机合成。

10.4　进一步的阅读材料

图书

Adams, M. (1996) *Enzymes and Proteins from Hyperthermophilic Microorganisms*. Advances in Protein Chemistry, Vol. 48. Academic Press, London.

Bickerstaff, G. (1996) *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana Press, New York.

Faber, K. (2000) *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer-Verlag, Godalming.

Gerhartz, W. (1990) *Enzymes in Industry: Production and Applications*. VCH, Weinheim.

Godfrey, T. & West, S. (1996) *Industrial Enzymology*, 2nd edn. MacMillan, Basingstoke.

Herbert, R. (1991) *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*. Blackie, Glasgow.

Horikoshi, K. (1998) *Extremophiles*. John Wiley & Sons, Chichester.

Johri, B. *et al*. (1999) *Thermophilic Moulds in Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, Boston.

Kelly, J. (1992) *Applications of Enzyme Biotechnology*. Plenum Publishing Co., New York.

Torchilin, V. (1991) *Immobilized Enzymes in Medicine*. Springer-Verlag, Godalming.

Uhlig, H. (1998) *Industrial Enzymes and their Applications*. Wiley Interscience, New York.

Wiseman, A. (1995) *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Ellis Horwood, Chichester.

论文

工业酶——概述及固定化

Cosnierm S. (1999) Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosensors Bioelectr*. **14** (5), 443-456.

Demirjian, D. *et al.* (1999) Screening for novel enzymes. *Biocatalysis-From Discovery to Application* **200**, 1-29.

D'Souza, S. (1999) Immobilized enzymes in bioprocess. *Curr. Sci.* **77** (1), 69-79.

Marrs, B. *et al.* (1999) Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2** (3), 241-245.

Ohdan, K. & Kuriki, T. (2000) An approach for introducing a different function to an industrial enzyme. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **12** (68), 403-410.

Pandey, A. *et al.* (1999) Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* **77** (1), 149-162.

Tischer, W. & Wedekind, F. (1999) Immobilized enzymes; methods and applications. *Biocatalysis-from Discovery to Application* **200**, 95-126.

来自极端菌的酶

Hough, D. & Danson, M. (1999) Extremozymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3** (1), 39-46.

Huber, H. & Stetter, K. (1998) Hyperthermophiles and their potential in biotechnology. *J. Biotechnol.* **64** (1), 39-52.

Madigan, M. & Oren, A. (1999) Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr. Opin. Microbiol.* **2** (3), 265-269.

Niehaus, F. *et al.* (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51** (6), 711-729.

Zeikus, J. *et al.* (1998) Thermozymes: biotechnology and structure-function relationships. *Extremophiles* **2** (3), 179-183.

(贾丽娜 译 谭天伟 校)

第11章

工业酶——蛋白酶和糖酶

11.1 蛋 白 酶

功能蛋白是生物分子中种类最丰富的一类。蛋白酶是目前工业中应用的最重要的一类工业酶，它的年销售额占了工业酶销售收入的50%以上，长久以来被广泛应用于食品及洗涤剂生产工业中。而近年，皮革加工业及医疗卫生事业中也开始使用蛋白酶，表11.1说明了蛋白酶工业应用的前景（包括第6章提到的蛋白酶在医疗方面的应用）。来源广泛的原材料（第2章）和全新的蛋白酶重组产品（第10章）使蛋白酶能够实现工业化。

表11.1 蛋白酶在工业中的应用

工　业	应　用
饮料	谷物蛋白促溶剂；啤酒稳定剂
洗涤剂	降解衣物上的蛋白污点
面包/糖果	改善谷蛋白(面筋)弹性
干酪生产	凝结酪蛋白，形成凝乳；熟化干酪
皮革加工	去毛；软化皮革
肉制品	嫩化肉质

11.1.1 蛋白酶的分类

蛋白酶可根据不同的标准分类，最常用的标准是肽键水解的位置或水解过程完成的分子机理。根据蛋白质底物的活性肽键相对位置不同，蛋白酶分为外肽酶及内肽酶，外肽酶可进一步分为氨肽酶、二肽基肽酶、三肽基肽酶、羧肽酶（表11.2）。内肽酶通常将蛋白质内部离羧基端或氨基端一定距离处的肽键裂解。绝大多数酶（包括外肽酶及内肽酶）对肽键的水解都表现出一定程度的选择性。如胰凝乳蛋白酶水解毗邻芳香族残基的肽键。

依据催化反应的基本机理，蛋白酶可分为4类：丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和金属蛋白酶（表11.3）。

表 11.2　不同外肽酶的肽链水解位点

外　肽　酶	肽链裂解位点
氨肽酶	$NH_2—O—O—O—O—(—O—)_n—O—O—O—COOH$（↓在 NH_2 后）
二肽基肽酶	$NH_2—O—O—O—O—(—O—)_n—O—O—O—COOH$（↓在第二个 O 后）
三肽基肽酶	$NH_2—O—O—O—O—(—O—)_n—O—O—O—COOH$（↓在第三个 O 后）
羧肽酶	$NH_2—O—O—O—O—(—O—)_n—O—O—O—COOH$（↓在末端 O—C 后）
肽酰二肽酶	$NH_2—O—O—O—O—(—O—)_n—O—O—O—COOH$（↓在倒数第二个 O 后）

表 11.3　蛋白酶的主要类型（基于水解作用机制）和各类代表

蛋白酶类型	代　表
丝氨酸蛋白酶	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、蛋白酶 K
天冬氨酸蛋白酶	胃蛋白酶、凝乳酶、微生物天冬氨酸蛋白酶
半胱氨酸蛋白酶	木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶、菠萝蛋白酶
金属蛋白酶	胶原蛋白酶、弹性蛋白酶、嗜热菌蛋白酶

丝氨酸蛋白酶在其活性位点上存在一个丝氨酸残基（图 11.1），是蛋白酶最常见的种类，古生菌、细菌、真核生物及病毒中会产生丝氨酸蛋白酶。除个别例外，大部分丝氨酸蛋白酶的分子质量为 18～35ku，在 pH7～11 时表现出最大活性。基于结构的相似性，蛋白酶可被分为几个亚族，从应用前景来看，细菌的枯草杆菌蛋白酶是最具工业意义的一个丝氨酸蛋白酶亚族，尤其是筛选枯草杆菌后产生的蛋白酶，目前已广泛用作洗涤剂。

从命名来看，天冬氨酸蛋白酶是一类酸性蛋白酶，在活性位点上存在一个必需的天冬氨酸残基（图 11.1），多数天冬氨酸蛋白酶在 pH 值为 3～4 之间时表现最大活性，等电点在 3～4.5之间，分子质量大约是 30～45ku。胃蛋白酶和凝乳酶是两类从动物胃中获得的天冬氨酸蛋白酶。微生物蛋白酶主要由毛霉、曲霉、青霉及根霉等几种微生物生产，已经广泛应用在干酪工业中。

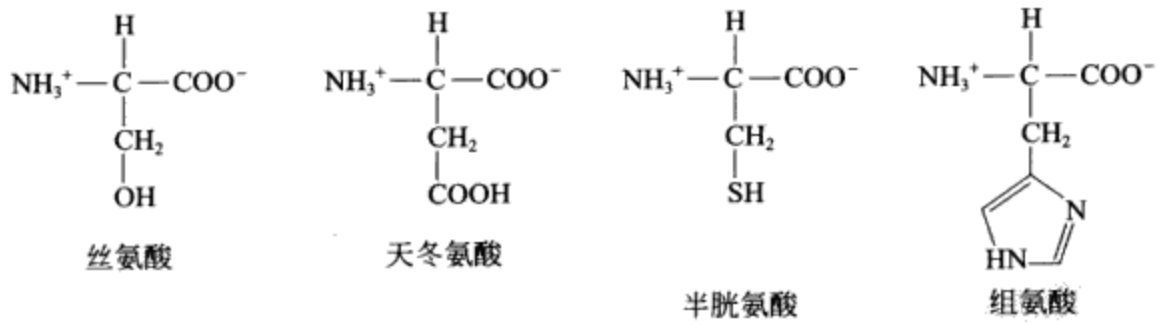


图 11.1　蛋白酶的催化活性必需的氨基酸结构

丝氨酸蛋白酶活性位点含有一个丝氨酸（也可是组氨酸或天冬氨酸）残基，半胱氨酸蛋白酶在其活性位点上含有半胱氨酸及组氨酸，同样天冬氨酸蛋白酶在其活性位点含有天冬氨酸残基

半胱氨酸蛋白酶在自然界中分布广泛，特点是在其活性位点处有一个半胱氨酸残基和一个组氨酸残基，这些残基是生物催化活性所必需。半胱氨酸蛋白酶中，最有代表性的是木瓜蛋白酶，通常具有还原性，在 pH 为中性时表现最大活力。一些半胱氨酸蛋白酶已经应用于工业生产（主要是食品生产）中。

金属蛋白酶的特点是（二价）金属离子是维持生物活性所必需的。如果在酶的生产过程中加入螯合剂来除去这些金属离子，就会破坏金属蛋白酶的催化活性。大多数金属蛋白酶在

碱性及中性条件下有最大活性，其中最有代表性的是微生物的嗜热菌蛋白酶，这是一类耐热性很好的中性蛋白酶。

11.1.2　洗涤剂用蛋白酶

工业上生产的大量水解蛋白酶都用于洗涤剂中。酶被用作洗涤剂始于 19 世纪末。由于所选的酶大多来自动物，会因为其他去污成分以及后续的洗涤过程而失活，因此这些应用大多没有成功。

大多数衣物容易被染料、生物分子、泥土和其他各种各样的颗粒物质弄脏，生物“污渍”包括蛋白质、脂类和糖类，这些污渍可能直接来自人类或动物（如脱落的皮肤及血液），也可能来自其他地方，如粮食或草。

现代的洗涤剂由很多配料组成，能够有效去除生物或非生物污渍。表 11.4 列出了一些代表性的组分。皂类和表面活性剂从纤维中去除大多数污物。过硼酸盐有漂白能力，从而帮助去除染料和污点，如茶渍、咖啡及酒渍。水解蛋白酶有降解蛋白质污物（如血渍、蛋渍和肉汁等）的功能。蛋白质在洗涤过程中容易变性聚集，从而更加难以从衣服上除去，加入在洗涤过程中有活性的水解蛋白酶就会促进降解从而除去这些顽固污渍。磷酸盐，例如三聚磷酸钠能够软化水质，保证洗涤剂能够有效地发挥最大作用。硬水中含有大量 Ca^{2+}，Ca^{2+} 和其他一些二价金属离子如 Mg^{2+} 或 Fe^{2+} 会与皂类作用产生沉淀，而沉淀的形成显然是不允许的。含 Ca^{2+} 的水有很多方法软化，常见的是加入分散剂，如聚磷酸钠，分散剂的作用是络合或螯合二价阳离子，从而阻止沉淀的产生，使用分散剂的同时要注意不能使用依赖二价阳离子维持生物活性的蛋白酶。洗涤剂中碳酸钠的存在维持了最佳清洁效果所需的碱性环境。

表 11.4　现代洗涤剂的主要组分

洗涤剂组分	功　能
皂类和表面活性剂	从纤维中去除污物颗粒，尤其是疏水分子
过硼酸钠	从纤维中去除染料及污点
三聚磷酸钠	软化水质
酶	去除生物污渍，主要是蛋白质
硅酸钠和碳酸钠	维持碱性环境
聚羧酸盐	在水中分散污渍颗粒
硅树脂	控制起泡
香料	增加纺织物一定的香味

世界上不同地区出售的洗涤剂配方不同，这反映了这些地区之间不同的洗衣习惯。例如，在欧洲全自动洗衣机设定的一整套洗衣过程要 1h，洗衣温度设为 40℃、60℃或 90℃，但在美国完成一套洗衣过程的时间大大缩短了（10～15min），在世界其他地区，洗衣温度普遍较低。

在标准洗涤条件下，洗涤剂中的蛋白酶在其他洗涤剂组分存在的条件下必须能表现出令人满意的催化能力。因此，这类蛋白酶必须能耐碱性 pH 值和相对较高的温度，并能在螯合剂、漂白剂和表面活性剂存在时保持稳定。在水解蛋白酶的几种类型中（表 11.3），只有丝氨酸蛋白酶可能应用于洗涤剂的生产，天冬氨酸蛋白酶在碱性 pH 值中失活，金属蛋白酶易受洗涤剂组分中螯合剂影响失活，同样半胱氨酸蛋白酶会在漂白剂造成的氧化环境中或高 pH 值条件下失活。

对比不同来源（特别是细菌）的丝氨酸蛋白酶，可以看出，枯草杆菌蛋白酶亚族最适宜用于洗涤剂生产，它们共同的特点是：①在洗涤剂溶液特定 pH 值下表现最大活性；②在其他洗涤剂组分存在条件下仍保持适当的或较高的稳定性；③底物范围广（如断裂连接着许多不同氨基酸残基的肽键）。目前，大多数洗涤剂使用的蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶，主要来源于地衣形杆菌（*Bacillus licheniformis*）、*Bacillus lentus*、*Bacillu alcalophilus* 和淀粉解凝酶杆菌（*Bacillus amylolique faciens*）（表 11.5）。这种胞外酶可由发酵天然生产菌大量生产。另外，有些菌通过同源或异源重组系统生产（第 2 章），以提高其表达水平。

表 11.5　主要的商业化枯草杆菌蛋白酶及其来源特性、制造商

来　源	作用的 pH 值范围	作用温度/℃	商　品　名
Bacillus licheniformis	7～10.5	50～65	Alcalase(Novo Norisk)　Maxatase(Genencor)
Bacillus lentus	9～12	45～70	Savinase（Novo Norisk）　Esperase（Novo Norisk）　Purafect(Genencor)
Bacillu alcalophilus	9～12	45～60	Maxapem(Gist Brocades)
Bacillus amylolique faciens	9～12	45～60	Maxacal(Genencor)

首先成功用于洗涤剂生产的蛋白酶是大肠杆菌蛋白酶，这是地衣形杆菌生产的一种单链丝氨酸蛋白酶，含有 274 个氨基酸，分子质量为 27.5ku。这种单链多肽的活性位点由 Ser221、Asp32、His64 组成。符合 Michaelis-Menten 方程，作用底物广泛，在 pH 值为 8～10之间时表现出最大活性，并且在温度超过 50℃时仍可保持稳定。许多生产菌系统克隆并表达了枯草杆菌蛋白酶基因。由于它的直链结构和动力学机理以及无与伦比的工业价值，正被进一步深入地研究。

淀粉解凝酶杆菌生产的枯草杆菌蛋白酶 BPN′在早期的洗涤剂生产中也有广泛应用。它含有 275 个氨基酸，尽管它的三亚基结构与枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 很相似，但其动力学性质有很大差别，这两种酶在液态洗涤剂中都很有效（洗液的 pH 值将会下降到 7.5～9.5）。强力的洗涤剂使洗液具有较高的 pH 值（通常为 9～11），这类洗涤剂多使用 *B. lentus* 生产的蛋白酶，因为这种蛋白酶在碱性条件下比另外两种蛋白酶更有活性。这种蛋白酶比 Carlsberg 或 BPN′要小（269 个氨基酸），具有与后两种蛋白酶 60%同源的区域。

尽管枯草杆菌蛋白酶的生化特性使得它们很适合用作洗涤剂，但人们还是通过蛋白质工程对它们进行了各种修饰。早期的蛋白质工程研究致力于增加酶的热稳定性，而降低洗涤温度的一般趋势使得这一目标不再重要。目前这一领域的研究重点是开发抵抗氧化的洗涤剂蛋白酶。

现代洗涤剂的漂白成分都会促进表面活泼氨基酸残基（如甲硫氨酸和半胱氨酸）进行氧化。用于去污剂枯草杆菌蛋白酶（表 11.5）活性中心的第 211 个氨基酸——丝氨酸的附近都含有表面活泼氨基酸——甲硫氨酸，甲硫氨酸残基的氧化（图 11.2）可以极大地降低酶的催化活性。科学家通过定点突变技术将甲硫氨酸转变为不易氧化的氨基酸残基，这种方法产生了第二代抗氧化性枯草杆菌蛋白酶，这种商业产品包括 Maxapem（Gist Brocades），Durazyme（Novo Nordisk）和 Purafect OXP（Genencor）。尽管甲硫氨酸的取代造成酶活力的降低，但如果用丝氨酸或丙氨酸取代，可减少酶活力的损失。

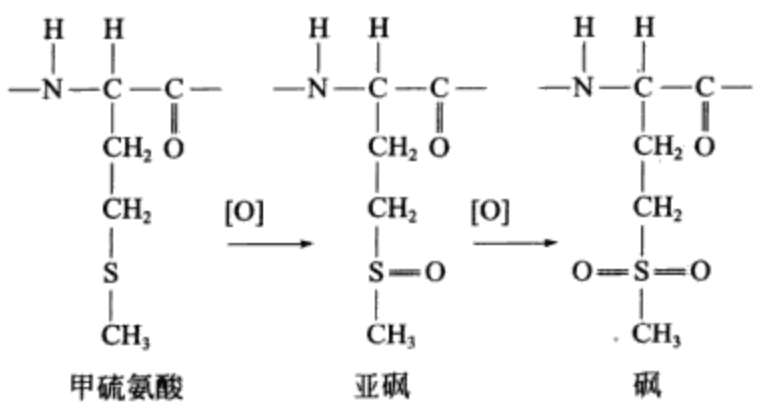


图 11.2　甲硫氨酸氧化生成亚砜并最终生成砜

11.1.3　干酪生产中使用的蛋白酶

凝乳酶，即胰凝乳酶，代表了另一类工业需求很大的水解蛋白酶。这种酶已经应用于干酪的生产工艺，在干酪生产的最初步骤中促使牛奶凝聚。凝乳酶催化牛奶 κ 酪蛋白的限制性蛋白水解断裂，从而降低了酪蛋白微团的稳定性，使它们聚沉，形成凝块（在牛奶中有 3 种酪蛋白亚基型：α、β 和 κ，这些蛋白形成球状颗粒——微团），将残液或乳清去除，对凝乳继续加工则生成干酪或其他乳制品。

凝乳酶是由小牛的第四个胃中获得的，提取方法是先用含硼酸的盐溶液对小牛胃的干条长时间处理，得到的酶提取物称之为粗制凝乳酶，具有蛋白水解与其他活性，其中凝乳酶含量不超过 2%～3%。

凝乳酶是一种天冬氨酸蛋白酶，由前凝乳酶原合成。指导新合成分子通过内质网的疏水性前导序列裂解，生成前凝乳酶，这种无活性的凝乳酶原。凝乳酶原在胃里酸性条件下发生自催化激活产生活性酶。凝乳酶分子质量为 35ku，由 323 个氨基酸组成。酶存在两个异构体，即胰凝乳蛋白酶 A 和胰凝乳蛋白酶 B，它们都在 pH 为 4.0 的酸性条件下具有最大活性。

小牛凝乳酶催化单个肽键的水解断裂，断裂发生在 κ 酪蛋白分子 105 位的苯丙氨酸和 106 位的甲硫氨酸之间，导致蛋白质的沉淀及凝乳的形成。凝乳酶对酪蛋白底物的高度专一性使它成为制备干酪的理想酶种，因为酪蛋白的进一步水解将产生劣质干酪。

对小牛的屠杀率反映了市场对小牛肉的需求，这种需求的波动对粗制凝乳酶的获得及价格有明显的影响。因此，科学家对许多替代来源的蛋白酶进行筛选试图找到一种合适的蛋白酶来代替牛凝乳酶。从家畜中得到的胃蛋白酶只能满足有限的需求，有时候可以与粗制凝乳酶一起使用。在筛选的微生物酶中发现很少能促进形成令人满意的凝乳的。但是毛菌中有几种嗜热型真菌却可以产生有活性的凝乳酶。毛菌酶通过发酵工程生产在经济和品质上都可行，像凝乳酶一样也可催化裂解酪蛋白分子，可以用于干酪生产。大部分这样的毛菌酶对湿热稳定，但温度过高还是会使其失活。

另一种方法是凝乳酶的 cDNA 在重组微生物体内的表达。凝乳酶 cDNA 已经在如大肠杆菌（*E. coli*）、构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）和曲古霉菌（*Trichoderma reesei*）中得以表达。在大肠杆菌 K-12 中表达出重组凝乳酶，它是非均一性蛋白产品，也是第一个人类可以直接利用的用 DNA 重组技术生产的食品添加剂。

重组凝乳酶的包含体在大肠杆菌中，要通过溶解之后复性才能获得活性酶。重组产品表现的生物特性与那些天然的凝乳酶相同，而且得到的产品纯度超过 60%。一些替代的重组系统可以胞外酶的形式合成大量的凝乳酶，因而在生产中具有明显的优势。

Gist Brocades 用工程菌 *Kluyveromyces lactis* 生产了一种重组凝乳酶（商品名为 Maxiren，图 11.3）。选用 *Kluyveromyces lactis* 是因为它长期在工业生产中安全地使用，无毒无害，有 GRAS（一般认为安全）认证。在 20 世纪 60 年代和 70 年代首次培育成功，生产的重组凝乳酶可直接用作健康食品及蛋白质补充物，用于非重组乳糖酶的制备已有许多年。

由于凝乳酶生产菌株含有小牛的凝乳酶原基因，该基因拼接上一段合适的酵母前导序列，以便重组产品能有效地从细胞中释放。发酵后加入酸会使无活性的凝乳酶前体自溶生成

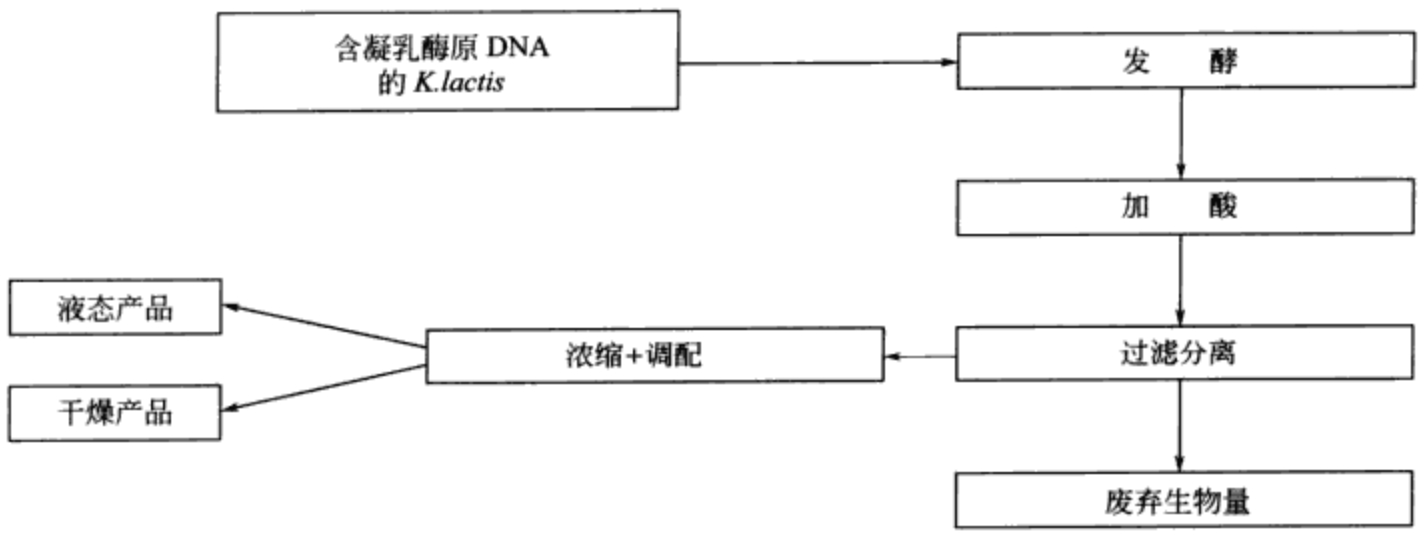


图 11.3 *Kluyveromyces lactis* 工程菌生产 Maxiren（重组凝乳酶）的流程

详见正文

活性乳酸酶。菌体通过离心及过滤去除，从而形成了富含凝乳酶的胞外培养液。因为 *Kluyveromyces Lactis* 只能分泌很少的蛋白质，胞外凝乳酶其实纯度很高，经浓缩调配后就可以液态商品出售，尽管产品中的基本成分一般以干燥形式（如粉末、颗粒或片剂）出售。重组的凝乳酶与其天然的形式在生物、化学性质上是相同的，而且符合伊斯兰教规。表 11.6 中总结 Gist Brocades 出售的 Maxiren 和其他蛋白酶在干酪工业的应用。

表 11.6 Gist Brocades 生产的主要蛋白酶

商　品　名	介　　绍
Delvoren 或 Caglio camoscio	小牛的第四只胃中提取的动物粗制凝乳酶，凝结活性来自于凝乳酶和胃蛋白酶的结合
Fromase	米根霉发酵产品，其活性来源于真菌酸性蛋白酶
Maxiren	*Kluyveromyces lactis* 生产的重组凝乳酶

注：这些酶用于干酪制作中促进凝乳的形成。

水解蛋白的活性有助于改善干酪的风味。许多肽可使食品具有理想的风味。所谓的苦味肽就是从一些干酪中分离得到的，但是大部分苦味肽的疏水氨基酸含量都很高，本不应该在干酪中出现的。这些使乳酪具有理想风味的肽正在被研究。

11.1.4　蛋白酶和肉质嫩化

大部分消费者认为肉的嫩化程度是肉类所应具备的最重要属性。肉变硬主要是因为连接组织的胶原蛋白，所以在出售前必须进行烹饪。在幼兽身上单个胶原分子交联程度较低，烹饪容易使其增溶形成明胶，因此幼兽的肉比较嫩。当动物慢慢长大，大量的胶原蛋白沉积在它们的连接组织上（以支撑它们较大的体积），单胶原分子的交联度也增加。对较大动物的肉进行烹饪，仅能促进部分胶原蛋白增溶，因此烹饪后的肉仍然较硬。

屠宰后将畜体在低温下保存几天（最好超过 10d），肉的嫩度将达到最大。这个过程称之为调制（也称老化或熟成）。因为在储存过程中，肌肉细胞（即肉）由于某些生理作用而破裂，释放出一些蛋白水解酶及其他水解酶。

人工嫩化（尤其老龄动物肉质的嫩化）使用的是木瓜蛋白酶。木瓜蛋白酶是植物中提取的一种半胱氨酸蛋白酶，它通过降解肌原纤维（肌肉中的收缩成分）和结缔组织蛋白来嫩化肉。其嫩化作用发生在烹饪过程中。木瓜蛋白酶对天然未经过处理过的胶原也有一定活性作用，而且木瓜酶有很好的耐热性，最适温度较高（50℃）。在超过 50℃时，天然胶原结构变松，容易受到附近高活性木瓜蛋白酶的作用。在烹饪过程中温度在 55～65℃之间时，胶原

会分解，木瓜蛋白酶可能在 80～90℃时才完全失活。

商业上常用粉末状的木瓜蛋白酶制剂，将其涂抹或撒在未烹饪的肉上，但这样仅仅会在肉表面上起嫩化作用。如果肉的切块较大的话，就必须应用某种工业设备将酶注入。一种新的方法是在屠宰前大约 30min 时将木瓜蛋白酶溶液输入动物体内，这样可促进酶在体内的分布，但在动物血液中加入一种活性蛋白酶将会提高血清补体系统的活化作用，导致动物休克死亡。所以向活动物体内注入的木瓜蛋白酶首先要进行化学氧化，半胱氨酸残基活性位点的氧化作用会使酶失活，因此在动物存活过程中木瓜酶都处于失活的氧化状态。在屠宰后，胞内糖酵解作用持续几小时，快速消耗掉肌肉氧分子，产生一个还原的环境，将木瓜酶还原再生其催化活性。尽管无花果蛋白酶及菠萝蛋白酶（其他植物蛋白酶）也可用于肉质嫩化，但因为经济因素多用木瓜酶。

11.1.5　蛋白酶和皮革生产

由动物皮生产皮革制品是一个多工序的过程（图 11.4），其中许多环节涉及到酶的利用。动物皮（图 11.5）主要由以下几种组分组成：水（64%）、蛋白质（主要是胶原蛋白，33%）、脂质（2%）及矿物质（0.5%）。皮革生产的基本过程包括脂质、水分和一些表面蛋白（如毛发）的去除，胶原蛋白的部分破坏及鞣革中的后续交联。

皮革生产中用到一系列的蛋白酶，如动物胰蛋白酶和微生物蛋白酶（酸性、中性及碱性细菌和真菌蛋白酶）。有些文献中也提到应用植物蛋白酶（木瓜蛋白酶及菠萝蛋白酶）、糖酶及脂肪酶，但糖酶及脂肪酶的活性没有得到广泛的应用。这些酶可降解或去除不需要的皮毛成分，同时在化学处理过程中会发生还原作用，减少化学污染物，产生环境效益。

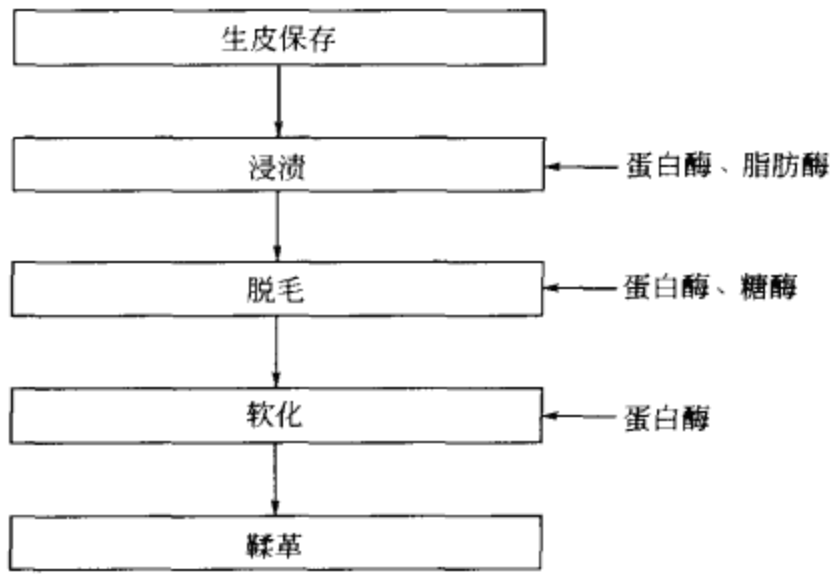


图 11.4　皮革生产工艺总览

重点工序至少部分依赖酶的活性，详见正文

新鲜的动物生皮原料对微生物十分敏感，皮革生产的第一步就是生皮保存（风干或脱水以及通过填充干盐腌渍）；这是为了使生皮可以安全地贮藏及运输。皮革生产是以称之为浸渍过程中的再水化开始的。将生皮在洗涤剂、防腐剂及酶的水溶液中浸泡几小时，这样除了可以对生皮再水化以外，还可以去除许多非纤维状蛋白质（球蛋白和白蛋白）。这步工序传统上多用胰蛋白酶，因为它能够有效地降解球蛋白并且能保证胶原蛋白完好无损（最终的皮革几乎全是胶原蛋白）。现在，中性及碱性细菌蛋白酶被应用于浸渍过程，有时也用胰酶制剂（既有水解蛋白酶活性，又有脂肪酶活性），研究表明，附加的脂肪酶活性可以通过引发脂质组分的降解而帮助清洁生皮。

传统工艺通过在生皮外侧抹上石灰和硫化钠组成的浆状混合物来脱毛。碱性条件及硫化物联合作用可以迅速溶解毛根蛋白，使毛与表皮分离，随后，碱性作用会使生皮溶胀。这个过程除了可以将毛除去之外，还可以剥去大部分表皮层，露出真皮层（图 11.5）以便进行下一道工序。现在脱毛工序中使用蛋白水解酶（碱性微生物蛋白酶），

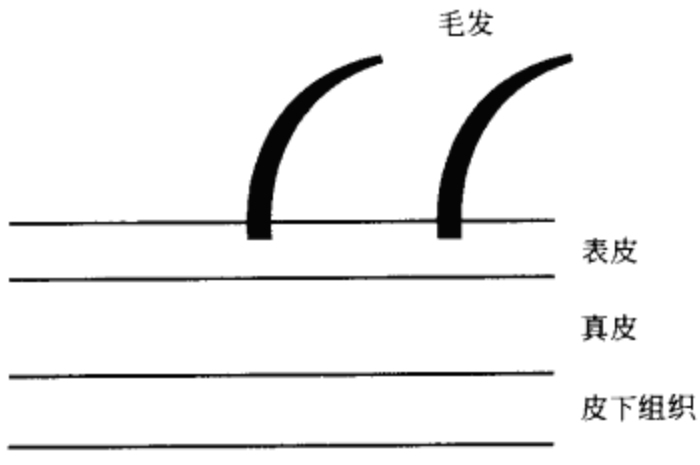


图 11.5　皮肤的结构

表皮（约占皮肤 1%）包括毛、毛根、皮脂腺（分泌油/蜡）和汗腺。真皮层（约占皮肤 84%）主要由胶原蛋白与结缔组织组成，皮下组织（约占皮肤 15%）由血管、神经、肌肉、结缔组织和脂肪组成

从而大大减少了污染性化学品的用量。有人报道蛋白酶与糖酶在促进脱毛中的合作效应，原因可能在于糖酶催化了基底膜中毛根周围的蛋白聚糖的降解。

生皮脱毛之后通常浸泡在酸中，使其 pH 值降低至中性。然后，开始酶催化的软化工序，其主要目的是去掉生皮中的非胶原蛋白，这些蛋白包括糖蛋白、蛋白聚糖、一些角蛋白和弹性蛋白。去除这些蛋白后，不仅纯化了留下的胶原蛋白网，而且使其变松（形成了更软的皮革）。软化过程经常将胰蛋白酶与微生物蛋白酶（*Bacillus* 和 *Aspergillus*）结合运用，这些酶在降解杂质蛋白时对胶原蛋白的降解作用最小。如果要求皮革具有高度的软化程度（即非常柔软），就要提高酶的浓度。软化后的皮革在随后的鞣革工序中经过化学处理，交联胶原蛋白纤维，形成皮革制品。

11.1.6　阿斯巴甜的合成

阿斯巴甜是 L-天冬氨酸与苯丙氨酸甲酯通过肽键缩合形成的二肽（图 11.6），其甜度约为蔗糖的 200 倍，已被广泛用作低热量甜味剂。阿斯巴甜的甜味来源于两个 L 型的氨基酸，可以通过化学法及生物法合成。化学合成成本较高，因为需要保护氨基酸的立体选择性。酶法因可自动地保护立体选择性而广受欢迎。中性金属蛋白酶，嗜热菌蛋白酶（源自 *Bacillus thermoproteolyticus*）以固定化形式应用。在特定动力学控制的条件下，蛋白酶合成肽键而不是水解肽键。

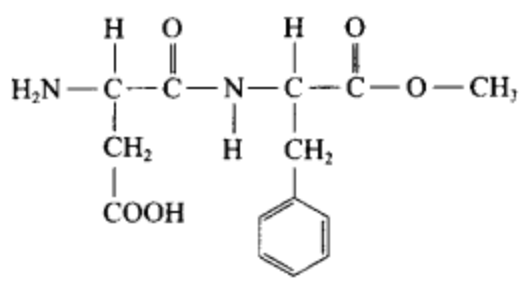


图 11.6　阿斯巴甜的结构

11.1.7　酿造与烘制面包工业中使用的蛋白酶

酿造之后的啤酒经冷却时会产生浓雾，这些浓雾主要由蛋白质、糖类和聚酚类化合物组成。因此在啤酒中加入蛋白水解酶可阻止浓雾形成，尽管多种微生物酶正接受评估，但植物产生的蛋白酶，如木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶仍是工业上最常用的。

真菌蛋白酶则可以应用于烘制面包工业中，一些酶（主要来自曲霉属）被修饰面粉中的蛋白组分，从而改变面团的结构。谷蛋白是面粉的一个主要蛋白成分，谷蛋白是麦醇溶蛋白和麦谷蛋白的复合体。在制作面团的过程中，当面粉浸湿时，谷蛋白与一部分水结合就会膨胀形成网格结构，对面团的拉伸产生一定的阻力。加入少量的中性真菌（*Aspergillus oryzae*）蛋白酶就会对谷蛋白的网格结构产生一定的降解作用，降低了面团抗拉伸的阻力，更有利于酵母发酵产生的 CO_2 保留在面团中，进而形成了膨松面包的孔状结构，并使面团在烘制过程中均一地膨胀。

11.1.8　蛋白废弃物的酶促转化

食品的生产与加工业产生了大量的废弃蛋白，其中包括动物废尸以及动物不可食用的部分，如头、脚、内脏和羽毛等。这些副产物大部分没有经济价值，通常是被看作废弃物来处理的，但有一些废料却可以被看作食物而通过称之为提取装置（rendering facilities）有效地回收利用，这些装置通常通过高压蒸煮来处理与提取动物废尸与内脏，从而产生一些极有价值的蛋白质，这些蛋白质可以用作家畜饲料。另外，这个过程可以对提取的物质进行有效的杀菌，防止病源动物身上疾病的传播。

上述提取过程不仅需要专用的、装备精良的设备，而且在蒸煮过程中需要较高的能量输入。因此另外一种可取代的方法就是应用降解酶，同样也可将生物废弃物转化为有价值的养料来源。这种生物过程不需要复杂的加工设备，也没有高能耗，酶催化转变废弃物比传统工艺更灵活，同时废弃物转化生成的产品范围拓宽，家禽羽毛的酶降解就是一个很好的例子。

据估计，在全球范围内每周有超过 4 亿只鸡被宰杀，每只有 125g 以上的羽毛，因此，全世界每周产生的羽毛废弃物约有 3000t。羽毛难以被动物消化的主要原因是动物不能水解结构高度规律性的 α 角蛋白。人们发明了一种酶水解工艺来降解这些羽毛废弃物，图 11.7 概括了主要工艺流程。简单地说就是将磨碎的羽毛浆、硫化钠和蛋白质水解酶进行混合，在一定的化学条件下蛋白质的二硫键会逐渐水解，最终蛋白质水解酶将磨碎的羽毛蛋白（α 角蛋白）水解为富含多肽、更容易消化的产品。

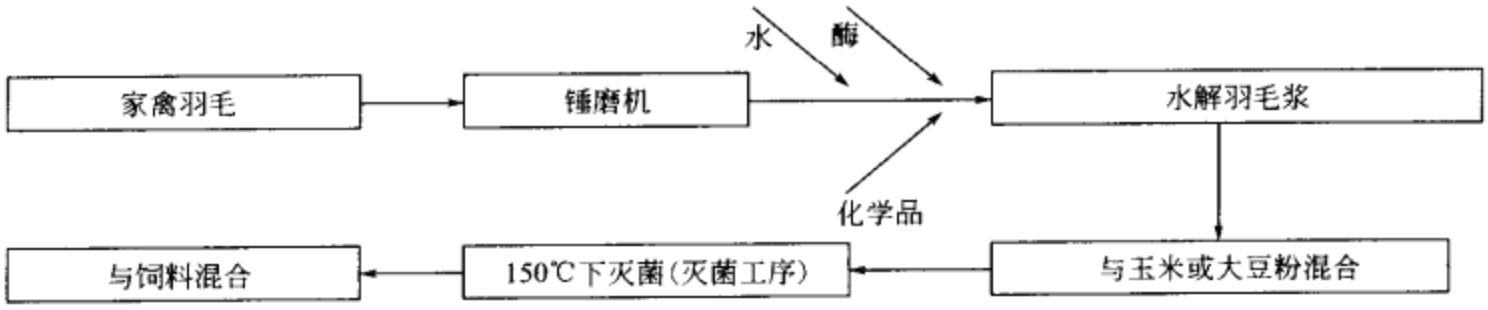


图 11.7　家禽羽毛从废弃物转变成氨基酸

羽毛水解液可以与另一种蛋白质原料（如大豆粉）混合配制，以提升产品的总营养价值。这种混合物必须通过加热灭菌以防止病原体的传播。羽毛的水解产品不仅可以用于动物饲料工业，也可以添加在家畜、猪、鱼和家养宠物的食物中。

动物毛发几乎全部由 α 角蛋白组成。每年在垃圾场堆积着几千吨的这类物质，这些废弃物也是酶催化降解的反应底物。人们设计了一个类似于羽毛降解过程的工艺，将这些底物转化成潜在的营养源。

大多数屠宰工厂产生了大量的副产物——血液，可以将血液离心以收集血红细胞。血红细胞占总血液蛋白的 70%，用碱性蛋白酶可以将血红细胞降解。这种蛋白酶的活性在将 pH 值降低到酸性条件下就会得到抑制。将降解产物过滤使其脱色，蒸发将其固物浓度升高到 40%，最后通过鼓风干燥机或喷雾干燥机干燥。这种最终的产品是几乎百分之百能消化的，并且经常构成幼龄动物的食物配方。

鱼加工厂也会产生大量的蛋白质副产物。这些副产物不只包括鱼的不可食用部分，也包括小的或坏掉的整鱼。这些废弃蛋白也可被酶催化为高营养价值的蛋白质水解物，这些水解

产物可以进入动物的食谱，如貂。

另外，有些降解蛋白产品还可以用做人类食品添加剂。通过牛、鸡、火鸡和猪骨的机械刮肉也可回收蛋白质碎屑，这些蛋白质碎屑经过部分水解可以制成一种含有很高肉提取物的产品，并添加到汤、酱和食物制品中。一些水解蔬菜蛋白（如大豆蛋白）的产物也可用作食物添加剂或调味剂。

11.1.9 蛋白酶的其他应用

蛋白酶在其他方面用量较小，包括隐形眼镜的清洁和体毛去除。隐形眼镜在使用过程中会吸附许多泪液溶质，因此有必要对隐形眼镜进行清洁。泪液是位于上眼睑外部的泪腺分泌的一种盐溶液。眨眼将泪液涂布于眼球上。泪液主要起到保护作用：

① 保持眼球表面湿润。湿润效应可保护角膜免受脱水作用的破坏，泪液中含有一种脂质，可以锁住水分，防止水分从眼睛表面蒸发。

② 截住特殊物质及细菌进入眼内。

③ 泪液中富含抗体，可以防止感染。

④ 泪液包含溶菌酶，可以通过降解细菌细胞壁的肽多糖使细菌溶解。

隐形眼镜上吸附的主要泪液溶质是蛋白质（大部分是前边提到的抗体和溶菌酶）、黏蛋白（具有润滑作用的高分子量糖蛋白）和脂质。标准隐形眼镜清洁剂可以适当地去掉这些物质，进而在眼镜表面形成沉积物，降低了隐形眼镜的透明度使其难以配戴。蛋白酶或蛋白酶和脂肪酶混合物经证实可以最有效地去除这些沉积物，这些含酶清洗剂现在已经商业化。清洗过程包括将隐形眼镜浸入酶液几小时（最好过夜），然后用大量盐水仔细清洗，清洗可以在戴眼镜之前将镜面的酶降解产物和有活性的酶彻底清除。

木瓜蛋白酶可以用于减慢或防止身体及腿上的体毛再生。体毛的去除可以通过化学法实现，也可用打蜡、拔去或刮去。实验证明用含木瓜蛋白酶的溶液规律性地清理长毛的地方会减慢或防止毛发再生。木瓜蛋白酶催化降解毛发，使毛囊变松，它也可以降解死亡的皮肤表皮细胞，使皮肤变得光滑柔软。由于木瓜蛋白酶不是从人身上获得的，有些人会对它过敏，所以，在大面积使用前应先在小块皮肤上实验敏感性。

11.2 糖 酶

多糖降解酶是一类最重要的工业大批量酶，包括淀粉酶、果胶酶和纤维素酶。另外，其他一些糖转化酶，如葡萄糖异构酶、蔗糖酶和乳糖酶也占据着一些重要的小商业市场。表11.7列出了一些工业上重要的糖类。

表 11.7 一些工业上重要的糖类

单 糖	二 糖	多 糖
葡萄糖	蔗糖	淀粉
果糖	乳糖	●糖原
半乳糖	麦芽糖	纤维素
		果胶

11.2.1　淀粉酶

参与淀粉水解的酶叫淀粉水解酶或淀粉酶，这些酶在工业中有着广泛的应用（表 11.8），这类酶分为 α-淀粉酶、β-淀粉酶、葡萄糖淀粉酶（也叫做淀粉糖化酶）、支链淀粉酶及异淀粉酶。酶催化淀粉降解生产葡萄糖、麦芽糖和其他低分子量糖类，而且酶催化葡萄糖异构化可以生成高果糖浆。

表 11.8　淀粉酶的主要工业应用

工业过程	淀粉酶
生产葡萄糖、麦芽糖浆	α-淀粉酶、β-淀粉酶、去支链淀粉酶
酿造/生产乙醇	α-淀粉酶、β-淀粉酶、葡萄糖淀粉酶
动物饲料添加剂	α-淀粉酶
面包烘制工业	α-淀粉酶、β-淀粉酶、去支链淀粉酶、葡萄糖淀粉酶
洗衣去污剂中的添加剂	α-淀粉酶
生产糊精	α-淀粉酶
加工果汁	α-淀粉酶、葡萄糖淀粉酶
纺织品脱浆	α-淀粉酶

植物的种子和块茎中能够产生大量淀粉，如玉米、小麦、大米、木薯及马铃薯。从这些廉价原料中可以广泛地得到淀粉以及淀粉水解酶的大规模生产，使得糖浆（含有葡萄糖、果糖和麦芽糖）的生产可行，糖浆对于食品与糖果工业非常重要，进而对传统的直接由甜菜和甘蔗生产蔗糖工艺构成了很强的竞争性。

11.2.2　淀粉

淀粉是植物中含量最大的多糖，是地球上除纤维素外数量最多的多糖。正如前文介绍的，在玉米等植物的种子及很多块茎中淀粉含量尤为突出，它在植物细胞中以颗粒形式存在。

淀粉聚合物无一例外地由葡萄糖单元组成，有两种形式，叫做 α-淀粉和支链淀粉（图 11.8）。α-淀粉是长直链聚合物，由一系列 D-葡萄糖分子通过 α1→4 糖苷键连接而成，每个 α-淀粉链的链长及分子质量都不同，较大的分子质量在 500ku 左右。

另外，支链淀粉是一个高度分支的分子，葡萄糖部分与 α1→4 糖苷键相连，部分与α1→6糖苷键相连。通常每 25～30 个葡萄糖残基后有一个分支点。植物淀粉中 70%～80%是支链淀粉。有些植物中，例如蜡状大米中的淀粉完全是支链淀粉（见表 11.9）。人们将多半淀粉用于人类食物及动物饲料工业生产，然而经修饰的淀粉也可用于纺织业、制药业、化妆品工业及生产肥皂。

表 11.9　植物淀粉中直链淀粉与支链淀粉的含量

来源		直链淀粉含量/%	支链淀粉含量/%
玉米	普通	28	72
	糯性	0	100
	高淀粉	65～85	15～35
高粱		28	72
木薯		16	84
竹芋		21	79
西米		26	74
马铃薯		20	80
小麦		30	70
大米	普通	20～30	70～80
	糯性	0	100

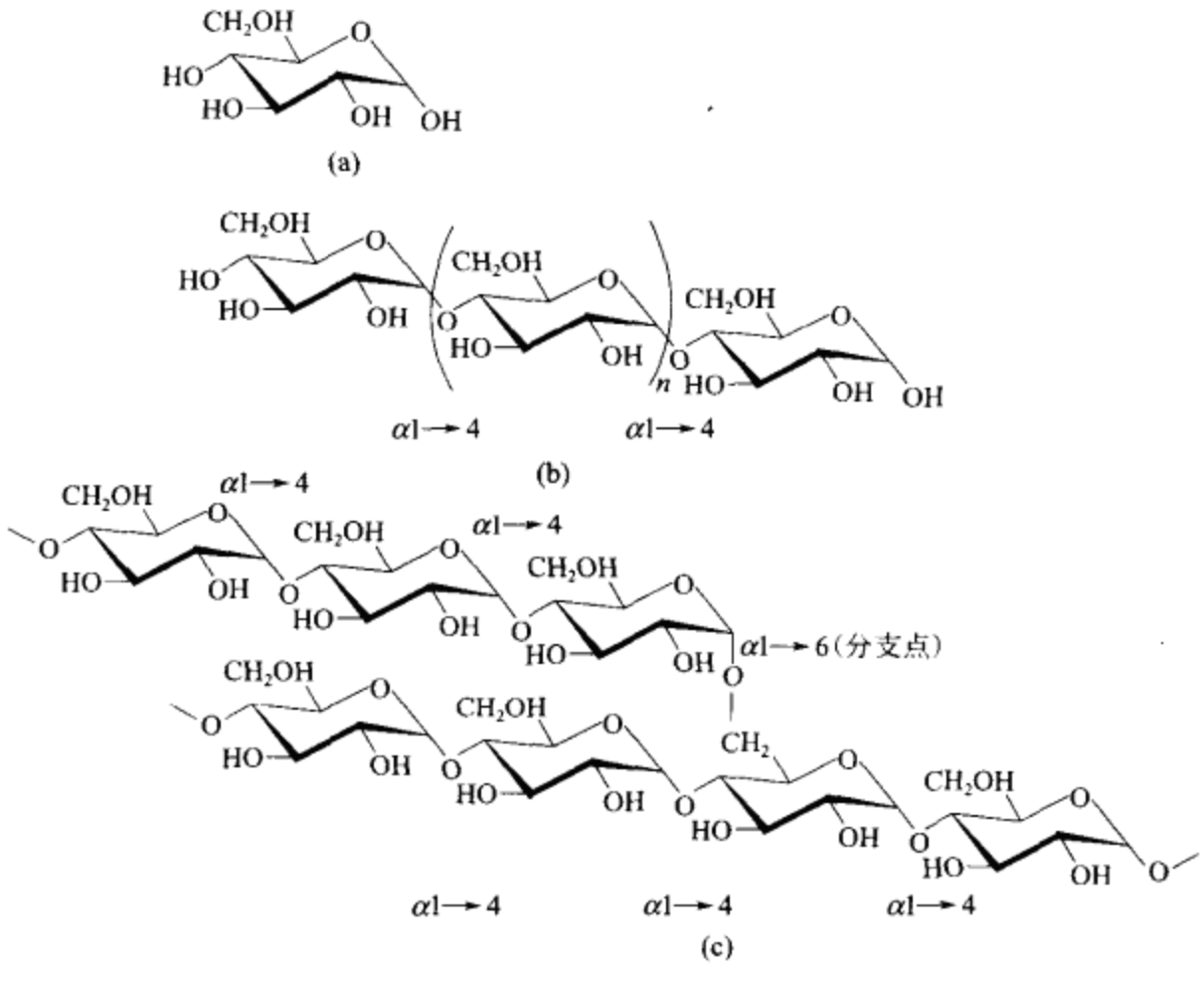


图 11.8 α-D-葡萄糖（a）、淀粉链片段（b）与支链淀粉的结构（c）

连续的葡萄糖残基之间形成葡萄糖苷键，连接着一个葡萄糖残基的 1 位碳原子与相邻葡萄糖残基的 4 位碳原子，这些键属于 α 构象，所以称之为 α1→4 糖苷键。在支链淀粉（c）中的分支点处，主链葡萄糖残基的 6 位碳原子与支链 1 号葡萄糖残基的 1 位碳原子连接，连接键称之为 α1→6 糖苷键

淀粉可以被酶法及化学法水解。人们最初使用化学法水解，在酸性条件下加热。现在这个方法被酶的应用所替代，酶催化水解产生较少的副产品而且比化学法水解产量高。

11.2.3 α-淀粉酶

淀粉水解的第一步是破裂淀粉粒，淀粉粒溶解，该过程被称为“糊化”，使得后续的催化降解可行。糊化一般是在将淀粉浆加热到 100℃以上维持几分钟。α-淀粉酶可以在加热前迅速加入，以使淀粉粒破裂更加高效。一旦淀粉粒破裂，再加入 α-淀粉酶使淀粉液化，这个过程降低了淀粉溶液的黏性。

α-淀粉酶在自然界分布广泛，可以从微生物与动物、植物组织中分离得到。α-淀粉酶是一种内切酶，能够随机地水解淀粉底物内部的 α1→4 糖苷键，但不能水解支链淀粉分支点处的 α1→6 糖苷键。但 *Thermoactinomyces vulgaris* 产生的 α-淀粉酶例外，它既可以水解 α1→4 糖苷键，又可以水解 α1→6 糖苷键。迄今为止，所有定性的 α-淀粉酶都是金属蛋白，这些酶通常也可以催化糖原与许多寡糖内部的 α1→4 糖苷键的裂解。

两种最常用的淀粉酶分别从 *Bacillus amyloliquefaciens* 和 *Bacillus licheniformis* 得到。杆菌生产的淀粉酶的最适 pH 值为中性或接近中性，在 Ca^{2+} 存在的条件下稳定。*Bacillus licheniformis* 产生的 α-淀粉酶有很好的热稳定性，特别适合于工业应用，它由 483 个氨基酸组成，分子质量约为 55.2ku，最适 pH 值为 6.0，最适温度为 90℃。大多数其他 α-淀粉酶，包括 *Bacillus amyloliquefaciens* 产生的 α-淀粉酶，在超过 60℃时就很

快失活。

重组 DNA 技术的应用，使得编码不同 α-淀粉酶的基因在多个重组生物中得以克隆和表达。例如，人类、小麦及细菌的 α-淀粉酶已经在酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中表达。最近，编码 *Bacillus licheniformis* α-淀粉酶的基因在转基因烟草中得以表达，这是大批量工业酶用重组植物生产的早期例证之一，重组蛋白的分子质量是 64ku，有别于野生杆菌淀粉酶酶的分子质量 55.2ku，二者之间的差异是源于酶在翻译后大量的糖基化。研究发现，含 α-淀粉酶的转基因植物种子直接应用于淀粉液化，效率很高。

许多真菌可以产生 α-淀粉酶，工业上用得最多的 α-淀粉酶是由曲霉菌产生的，尤其是米曲霉（*Aspergillus oryzae*）（表 11.10）。

表 11.10　一些重要的工业淀粉酶的来源及特征

酶	内酶(*endo*-acting)/外酶(*exo*-acting)	葡萄糖苷键	来　源	最适 pH 值	最适温度/℃
α-淀粉酶	内酶	α1→4 糖苷键	*Bacillus subtilis*	6.0	65
			Bacillus licheniformis		90
			Bacillus amylolique faciens	5.5	60
			Aspergillus oryzae	4.5	60
淀粉糖化酶（葡萄糖淀粉酶）	外酶	α1→4 糖苷键	*Aspergillus niger*	4.5	60
β-淀粉酶	外酶	α1→4 糖苷键	*Bacillus* sp.	5.0	60
			Clostridium sp.	5.5	80
支链淀粉酶	内酶	α1→6 糖苷键	*Klebsiella aeogens*	5.0	60
异淀粉酶	内酶	α1→6 糖苷键	*Pseudomonas* sp.	4.0	55

11.2.4　葡萄糖淀粉酶

葡萄糖淀粉酶又叫淀粉糖化酶，是许多真菌生产的一种胞外酶，最显著的应是曲霉属（*Aspergillus*）和根霉属（*Rhizopus*）。黑曲霉（*Aspergillus niger*）产生的酶在工业中应用最广泛。

葡萄糖淀粉酶从淀粉分子的非还原末端开始，依次水解 α1→4 糖苷键，同时也催化支链淀粉分支点上的 α1→6 糖苷键水解，但速度要慢得多，进而葡萄糖淀粉酶催化淀粉水解为葡萄糖。工业上通常在淀粉液化后，使用细菌 α-淀粉酶催化生成葡萄糖浆，这个工序叫做淀粉的糖化。

葡萄糖淀粉酶具有一定的耐热性，但在 60℃以上不稳定，因此在加入糖化酶之前，液化的淀粉必须降温，同时 pH 值调到酸性，保证酶达到最佳的活性。有一种葡萄糖淀粉酶具有更高的最佳活性温度，受到工业界关注。许多动物和植物也可以生产葡萄糖淀粉酶，但它主要是由微生物生产的。在过去的几年中，从一些厌氧和好氧微生物中分离得到许多葡萄糖淀粉酶，大多数在酸性条件下具有最佳活性，最适温度超过 60℃的很少（表 11.11）。这些酶当中没有酶显示出物理化学特性，使其比当前商业用酶更加适合用于工业生产。寻找耐热性更好的葡萄糖淀粉酶，必须通过：①筛选嗜热菌与超嗜热菌；②中温菌的葡萄糖淀粉酶经蛋白质工程改善其热稳定性与最佳活性。图 11.9 概括了由淀粉生产葡萄糖浆的全部过程。这种方法除了生产结晶葡萄糖以外，生产的葡萄糖浆通常可以直接用于食品及其相关行业。进一步的应用是用葡萄糖异构酶将葡萄糖转化为果糖，制得高果糖浆。

表 11.11　葡萄糖淀粉酶的最适温度及最适 pH 值

来　源	最适温度/℃	最适 pH 值
Aspergillus awamori	60	4.5
Aspergillus oryzae	60	4.5
Aspergillus terrens	60	4.5
Cephalosporiura charticola	60	4.5
Corticu rolfsii	50	4.5
Clostridium thermosaccharolyticum	70	5.0
Humicola lanuginosa	65	4.9
Mucor rouxianus	55	4.6
Penicillium oxalicum	60	5
Rhizopus delemer	40	4.5

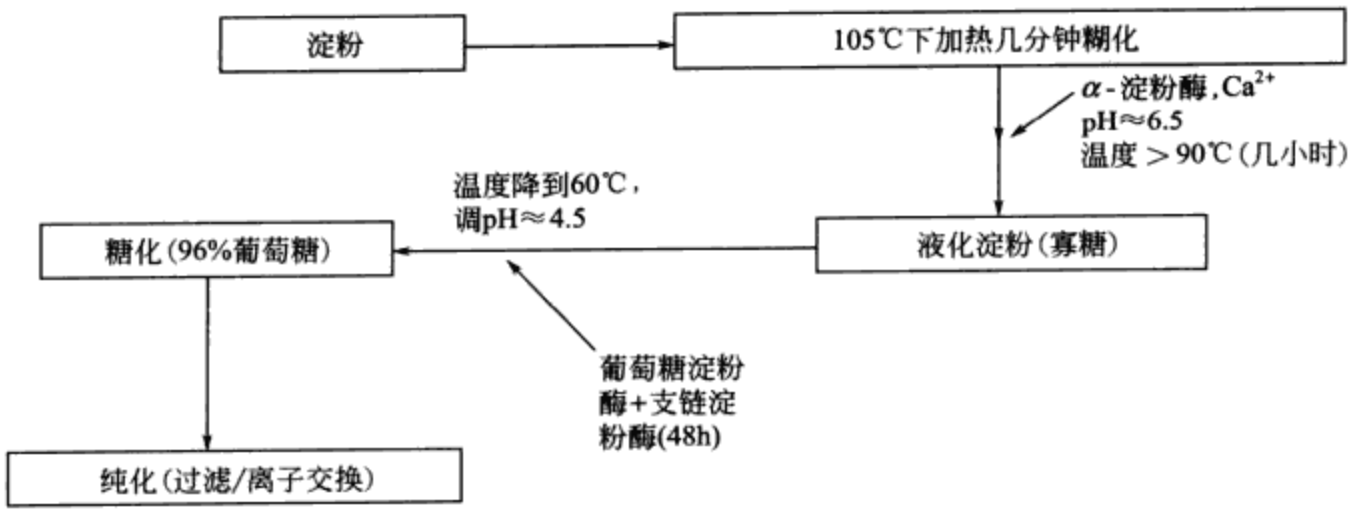


图 11.9　淀粉通过可控水解得到含量为 96% 以上的葡萄糖浆

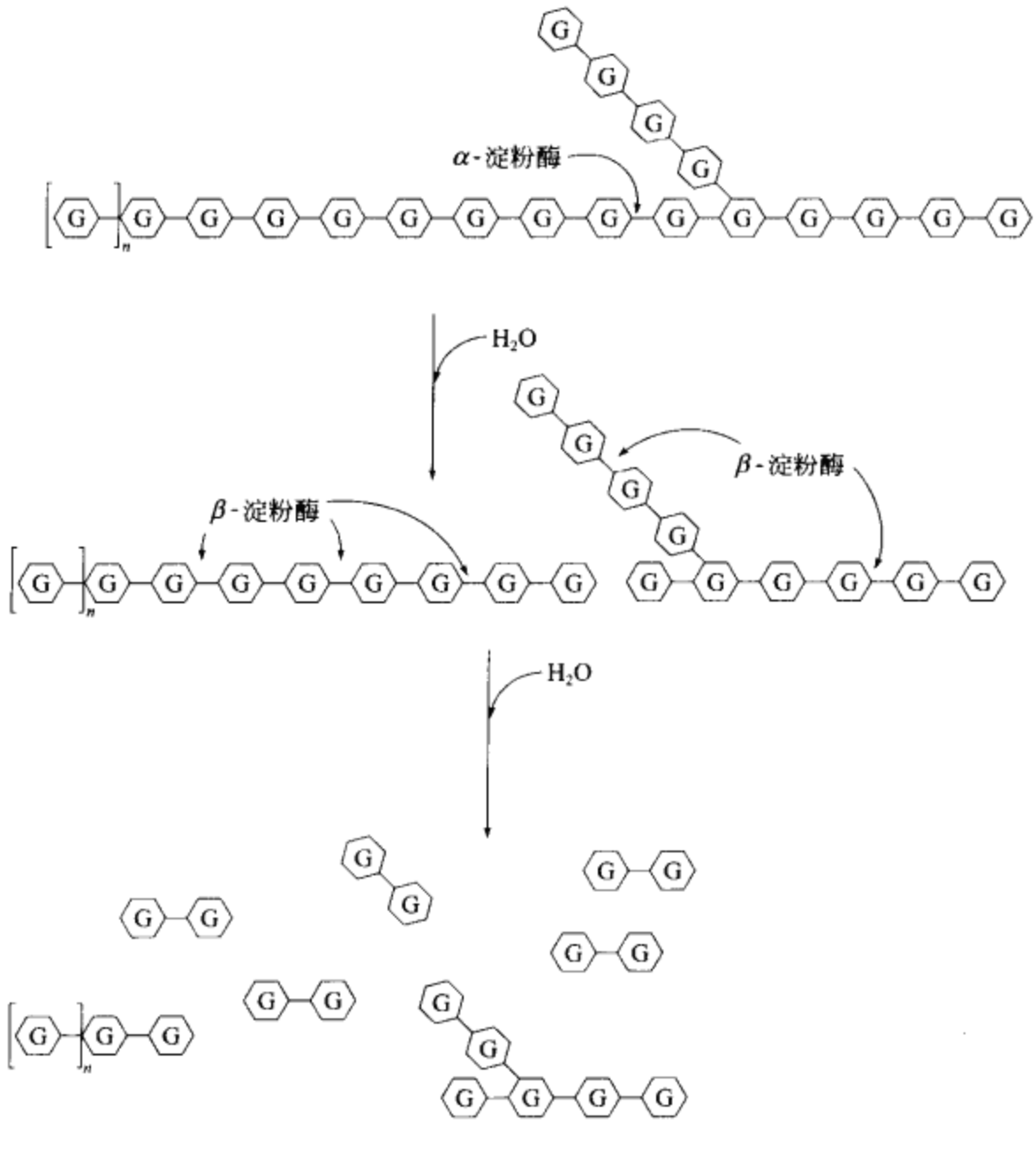
工艺流程和条件如图所示，在糖化过程中除了加葡萄糖淀粉酶以外还可以加支链淀粉酶，支链淀粉酶可以水解 α1→6 糖苷键

11.2.5　β-淀粉酶

与 α-淀粉酶不同，β-淀粉酶是一种外切酶，从淀粉分子的非还原末端依次催化水解 α1→4 糖苷键，反应通过 β 型的转换生成麦芽糖（图 11.10）。同 α-淀粉酶一样，β-淀粉酶也不能水解 α1→6 糖苷键，因此支链淀粉的分支点限制了 β-淀粉酶将淀粉水解为麦芽糖。换言之，淀粉分子若不存在这些分支点，β-淀粉酶可以完全催化其降解。总之，大部分淀粉通过 β-淀粉酶水解，产生麦芽糖和更大的寡糖的混合物（通常是 β 葡聚糖）。

β-淀粉酶由高等植物产生，分子质量约在 60ku（谷物 β-淀粉酶）与 150ku（甘薯 β-淀粉酶）之间。植物 β-淀粉酶不需要金属离子维持活性。它在比中性略低的 pH 值下达到最大活性，在 60℃以上孵育任意一段时间都会失活。商业化植物 β-淀粉酶来自大麦，而在世界的某些地区来自大豆。用 α-淀粉酶及 β-淀粉酶同时水解淀粉得到的糖浆，含有 2%～8% 的葡萄糖、40%～60% 的麦芽糖、10%～25% 的麦芽三糖和少量的 β-葡聚糖。

许多微生物也产生 β-淀粉酶，最显著的是杆菌（Bacilli），也包括多种假单胞菌（*Pseudomonas*）和链霉菌（*Streptomyces*）。细菌 β-淀粉酶在商业上应用最为广泛，最适温度为 55～60℃。更加耐热的 β-淀粉酶受到工业界关注，至少已经有一种耐热 β-淀粉酶被报道，*Clostridium thermosulfurogenes* 产生的 β-淀粉酶在 85℃以上的温度下仍然保持着相当大的活性。



注：　G　=葡萄糖

G—G　-麦芽糖

图 11.10　支链淀粉在 α-淀粉酶及 β-淀粉酶作用下的水解

α-淀粉酶随机水解内部的 α1→4 糖苷键，不能水解 α1→6 糖苷键。β-淀粉酶从非还原末端依次催化淀粉分子水解生成麦芽糖单元，也不能水解分支点除的 α1→6 糖苷键

11.2.6　α1→6 葡萄糖苷酶

α1→6 葡萄糖苷酶是一类可以水解支链淀粉分支点处 α1→6 糖苷键的淀粉分解酶。淀粉糖化酶就是一种 α1→6 糖苷酶。因为无论是 α-淀粉酶还是 β-淀粉酶都不能催化水解支链淀粉中的 α1→6 糖苷键，所以脱支酶在淀粉的完全降解中起着核心的作用。几种其他的 α1→6 糖苷酶催化水解分支点的糖苷键的效率和速度比淀粉糖化酶高得多，其中最重要的是支链淀粉酶和异淀粉酶。在糖化过程中经常使用的酶如图 11.9。

尽管支链淀粉酶和异淀粉酶都能裂解支链淀粉的 α1→6 糖苷键，但它们降解多糖（支链淀粉）的能力不同，支链淀粉酶能够降解支链淀粉，但异淀粉酶不能。支链淀粉是一种线性多糖，由 1500 多个葡萄糖分子组成，其基本的重复结构单元 3 个葡萄糖残基组成，3 个葡萄糖残基通过两个 α1→4 糖苷键相连，每个这样的麦芽三糖单元彼此通过 α1→6 糖苷键相连，如图 11.11 所示。

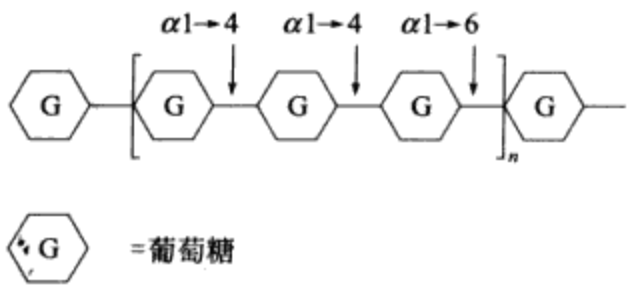


图 11.11 支链淀粉的结构

支链淀粉酶于 20 世纪 60 年代早期在气杆菌（*Aerobacter*）中发现。多种细菌可以产生支链淀粉酶，包括一些杆菌和链球菌属。其最适温度为 60℃，所以非常适合与淀粉糖化酶一起使用。异淀粉酶可由许多微生物产生，最初由酵母中分离得到，很多细菌也能产生，这些细菌包括杆菌。*Pseudomonas amyloderamosa* 的突变株生产的胞外异淀粉酶产量很大，在工业中应用很广。

最近，从几种嗜热性微生物中分离到的一些支链淀粉酶表现出新的活性，这些微生物包括许多梭菌，以及 *Thermoanaerobium* 和 *Thermus* 的许多菌株。一些酶在诸如大肠杆菌（*E. coli*）和枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）的重组系统中以异源蛋白的形式生成，大多数酶有很好的热稳定性，可在超过 90℃ 的温度下长时间保持活性。这些新型支链淀粉酶（有时称作淀粉支链淀粉酶）最激动人心的特征也许在于：能水解一些糖类（如支链淀粉）的 α1→6 糖苷键和另一些糖类（如淀粉）的 α1→4 糖苷键，而普通的支链淀粉酶不能水解淀粉或支链淀粉的 α1→4 糖苷键，例如从 *T. brockii* 中得到的纯化支链淀粉酶只能水解支链淀粉的 α1→6 糖苷键，但是对淀粉的 α1→4 糖苷键几乎没有显示出活性。

11.2.7 葡萄糖异构酶

大量廉价的、来源稳定的淀粉的酶法水解，使得大量生产葡萄糖浆在经济上可行。尽管葡萄糖浆可直接利用，但许多情况下还是将其转化为高果糖浆，因为果糖比葡萄糖甜得多（表 11.12），所以在用作糖果、冰激凌和软饮料中的甜味剂时更具有工业优势。

表 11.12 工业上常用甜味剂的相对甜度

糖	相对甜度/%	糖	相对甜度/%
蔗糖	100	果糖	130
葡萄糖	70	麦芽糖	40

注：为了便于比较，蔗糖的相对甜度被假定为 100%。

葡萄糖可通过化学法及酶法异构化生成果糖（图 11.12），化学转化通过在高温下加碱来实现，较低的转化率和产生的副反应（如产生阿洛酮糖等非代谢糖类、色泽深以及臭味的糖衍生物）使得化学法的应用受到限制。葡萄糖异构酶在室温和接近中性的 pH 值条件下催化得到含果糖 42%的糖浆，该方法于 20 世纪 60 年代晚期在美国首次实现工业化。近期开发的提取工艺可以生产更高果糖含量的糖浆。

多种微生物生产的葡萄糖异构酶已经用于工业上生产高果糖浆，产生这种酶的细菌包括气杆菌（*Aerobacter*）、杆菌（*Bacillus*）和 *Streptomyces albus*，*Lactobacillus brevis*，*Actinoplanes missouriensis*。商业化葡萄糖异构酶主要来自 *Actinoplanes missouriensis*，*Bacillus coagulans* 和链霉菌（*Streptomyces*）的几个种。

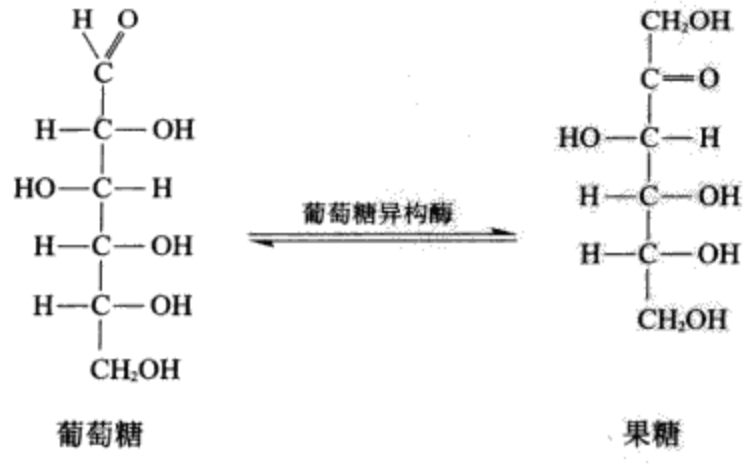


图 11.12 D-葡萄糖（一种己醛糖）异构化形成 D-果糖（一种己酮糖）

上述来源与许多其他来源（主要是微生物）的葡萄糖异构酶已经被纯化和表征。这些研究揭示了下列信息。葡萄糖异构酶通常可以异构化几种糖，其催化的最多的反应是 D-葡萄糖和 D-果糖以及 D-木糖和 D-木酮糖之间的相互转化。另外，有几种酶可以催化 D-核糖、D-阿洛糖、L-阿拉伯糖和 L-鼠李糖的异构化。葡萄糖异构酶通常需要二价离子（如 Mg^{2+}、Co^{2+} 或 Mn^{2+}）存在以达到最大活性。酶的分子质量在 50ku 到 190ku 之间，有活性的异构酶往往是同型二聚体或同型四聚体，每个亚基通过非共价作用力连接。微生物葡萄糖异构酶的最适温度在 60～80℃之间，最适 pH 值为 6～9。

大多数微生物产生的葡萄糖异构酶是一种胞内酶，在分离过程中要破碎细胞。与胞外酶相比，位于胞内对其分离纯化提出了更高的技术和成本要求。

许多关于葡萄糖异构化工业应用的研究，开始时使用溶解酶。然而大多数工业规模的异构化系统使用的是固定化酶，从经济角度来看，固定化酶是很可观的，因为其实现了酶的重复利用（第 10 章）。

正如大多数其他商业用酶一样，许多葡萄糖异构酶是用重组的方式在同源和异源系统中生产的。蛋白质工程研究也已经开始，定点突变用来增加酶的热稳定性，降低其最适 pH 值，或改变其底物专一性。几项提高酶热稳定性的研究，是通过改变蛋白质表面氨基酸残基来增强酶各个亚基间的非共价作用力（从而使它们在更高的温度下仍能相连）可以提高热稳定性。虽然蛋白质表面疏水氨基酸残基的改变在某些程度上确实提高了酶的热稳定性，但是研究也同时说明引入二硫键和盐桥并没有起到什么作用。

11.2.8　淀粉转化的工业价值

为了得到专一的终产品，可以通过改变淀粉水解酶的组合来水解淀粉。主要的商业终端产品包括麦芽糊精或玉米糖浆干粉、麦芽糖浆、葡萄糖浆或高果玉米糖浆（图 11.13）及环糊精（下一章讨论）。

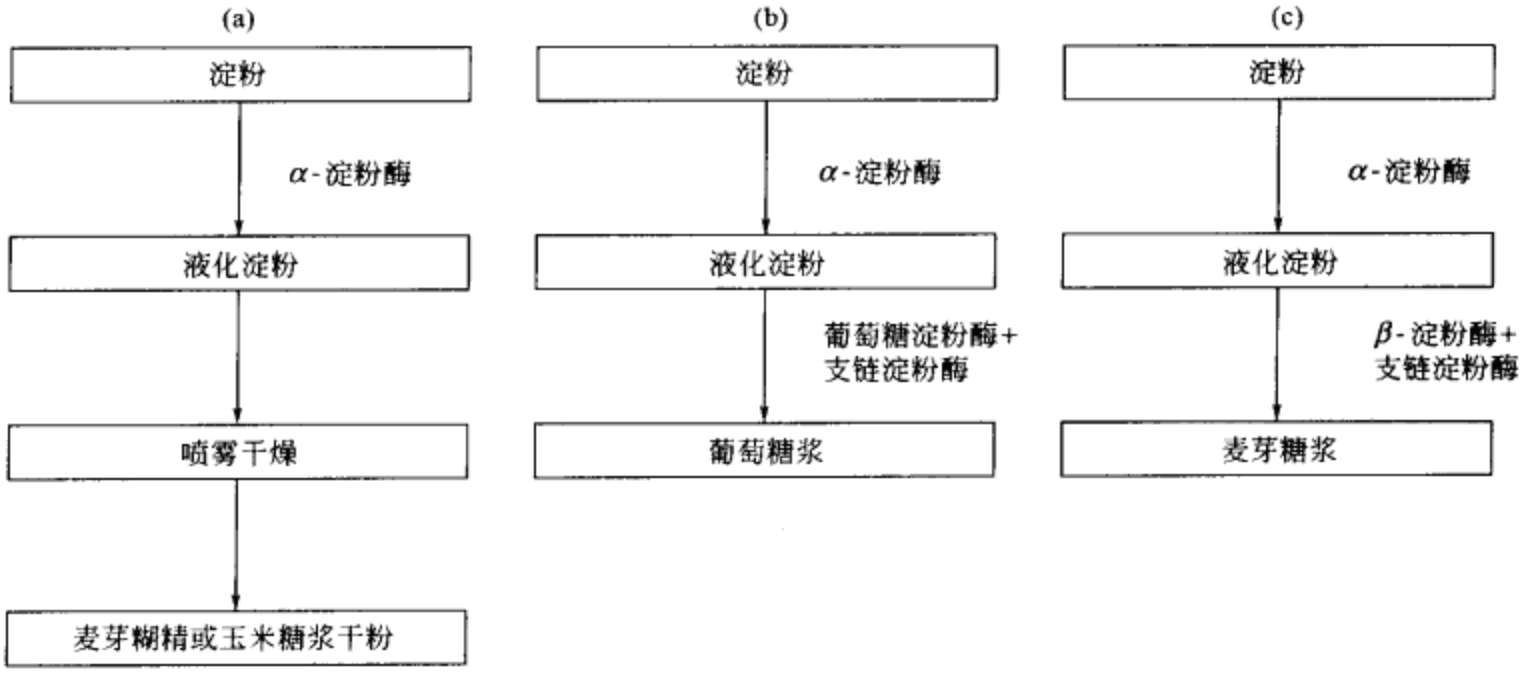


图 11.13　淀粉水解产生重要的工业产品

（b）中，α-淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、支链淀粉酶联合催化产生葡萄糖浆；（c）中，α-淀粉酶、β-淀粉酶、支链淀粉酶联合催化产生麦芽糖浆。简明起见，图中省去了过程参数（pH 值及温度的调节，加稳定剂等）

麦芽糊精是通过α-淀粉酶催化淀粉的部分水解产生的（图 11.13），生成的产物经过提纯得到不甜的糖类营养品，主要包含以α1→4 糖苷键连接的糖单元。尽管提纯的产品成分会变化，但一般来说包括：葡萄糖（1%）、麦芽糖（3%～5%）、麦芽三糖（5%～10%）、麦芽四糖（6%）和余下的分子量更大的糖类（75%或更多）。当淀粉被α-淀粉酶水解到需要的程度以后，将溶液 pH 值从 6.5 降成 3.0，再将淀粉浆加热至沸腾，保持约 5min，使α-淀粉酶完全失活，过滤，流过碳柱，除掉微粒和色素，纯化后的麦芽糊精经过蒸发、喷雾干燥得到粉末状产品。

麦芽糊精存在许多有用的特性，包括低吸湿性、一种清淡的不甜调味剂和阻止冰激凌与相关冷冻制品中冰晶的形成。它被用作软糖中的配料，以提供软糖的黏性及咀嚼性；也被加到硬一些的糖中，以保持糖的含水量并延长其保存期。在低脂食品中，高分子量的麦芽糊精产品（即产品的 95%由五糖及更大的糖组成）可作为脂肪的替代品，其口感和脂肪接近，但其热量却还不到脂肪的一半（按照相同质量计算）。在制药工业中，麦芽糊精可作为片剂生产的胶黏剂以及一些片剂或胶囊的涂层剂。玉米糖浆干粉与麦芽糊精相似，只是玉米糖浆干粉水解得更完全，总的来讲，其应用与麦芽糊精产品相似。

葡萄糖浆可以用于生产葡萄糖晶体，而葡萄糖晶体则是生产许多有机酸和其他化学品的原料，也是生产高果玉米糖浆的原料。高果糖浆的甜度与蔗糖相当（当果糖含量高时可能比蔗糖甜），但甜度相当的高果糖浆比蔗糖便宜 10%～20%。因此，在世界许多地方，尤其是美国，高果糖浆已经替代了蔗糖成为食品添加剂。高果玉米糖浆作为甜味剂用于蛋糕、糖果、软饮料、罐装食品、果酱、果胶及番茄酱中。麦芽糖浆黏度较低、吸湿性小，热稳定性好、甜度适中，可以作为多种食品、糖果、软饮料的甜度剂，也用于冰激凌中，以控制冰晶的形成。在医学上，麦芽糖浆用作糖尿病患者的静脉注射液。

淀粉降解酶也被用来生产酒精饮料和制作面包。酒精饮料的酿造生产有赖于酵母在麦芽存在时发酵糖类和其他添加的一些糖类的能力。酵母细胞没有降解淀粉的能力，它们只能用葡萄糖或其他简单的单糖和二糖作为生长的底物。在发酵前，应促使谷物发芽，因为发芽的种子产生的多种酶，不仅能降解淀粉也能水解纤维素和种子中的其他结构多。随后可以通过加热来阻止种子发芽，防止种子进一步生长。这时的种子里已含有α-淀粉酶、β-淀粉酶，可以水解淀粉产生酵母发酵所学的葡萄糖和其他糖类，这种工艺叫做麦芽制造法。这是用种子产生淀粉水解酶的传统工艺，现在已经被加入微生物的外源淀粉水解酶扩充或代替。

与发芽前相比，发芽后谷物中β淀粉酶的含量相对恒定，而α-淀粉酶的含量有所升高，因此面粉通常含有较低浓度的α-淀粉酶。向这种面粉中添加真菌α-淀粉酶加入面粉中，能够提高淀粉降解的效率，使面团易于处理，并使酵母发酵成为可能，因而促进了面包的发酵，增加了面包的体积，增强了面包的结构。

11.2.9 α-淀粉酶用作洗涤剂

衣物上的最普通的污点之一就是糖类食物污点。马铃薯、麦片、肉汁、意大利面条、巧克力、布丁和婴儿食品等都有很高含量的淀粉或改性淀粉。这些淀粉污点在较高的洗涤温度下才能有效去除，但是在洗涤剂中加入α-淀粉酶，在较温和的条件下就可以将它们除去。

早在 20 世纪 70 年代早期人们就开始将淀粉酶加入洗涤剂中，80 年代这一技术得到普遍青睐。到 90 年代中期 90%以上的洗衣粉中都含有淀粉酶，含有α-淀粉酶的洗碗剂的比例

也在上升。大多数传统的洗涤剂淀粉酶是由 *Bacillus subtilis*，*Bacillus amyloliquefacience* 或 *Bacillus licheniformis* 发酵生产的，其中 *Bacillus licheniformis* 产生的淀粉酶应用最为广泛，因为这种酶有很好的热稳定性、能耐受蛋白酶水解、洗涤效果好，它在市场上的商品名为 Maxamyl（Genencor Int.）及 Thermamyl（Novo）。人们最初开发淀粉酶是想用于淀粉工艺，却意外地发现它在洗涤剂中可以得到了很好的应用。α-淀粉酶在不含漂白剂的洗涤剂中比较稳定，但当洗涤剂中存在漂白剂时，大多数淀粉酶会失去大部分活性（经证实这种洗涤剂保存 6 个月后，淀粉酶的活性降低了一半以上）。

已经阐明了几种微生物 α-淀粉酶的三维结构，对其中的一些开展了蛋白质工程研究。结果发现，用洗涤剂蛋白酶取代 α-淀粉酶表面的氧化敏感性氨基酸残基，将会提高 α-淀粉酶对漂白剂的耐受性。

对 *Bacillus licheniformis* 的 α-淀粉酶进行定点突变，研究表明将 α-淀粉酶分子表面的 197 位甲硫氨酸替换为一个非氧化性的氨基酸，将得到一种抗氧化性产品（图 11.14）。根据这一研究，Genencor Int. 和 Novo 公司分别生产了 Purafect OxAm 和 Duramyl 两种产品，并在 20 世纪 90 年代中期推向市场。

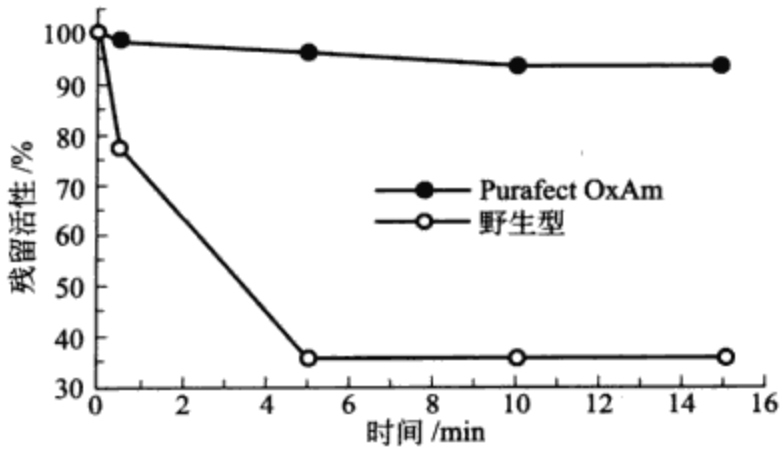


图 11.14　野生型 *Bacillus licheniformis* α-淀粉酶及其工程产品 Purafect OxAm 在过乙酸（一种普通的洗涤剂用漂白剂）存在下的稳定性

人们试图通过蛋白质工程开发一种存在较低 Ca^{2+} 浓度条件下热稳定性更好的 α-淀粉酶。Ca^{2+} 是大多数细菌 α-淀粉酶的辅因子，可以提高淀粉酶的热稳定性，增强其蛋白水解的耐受性。用定点突变技术在酶分子的钙离子结合位点附近引入一些带负电的氨基酸残基，从而生成一种对 Ca^{2+} 亲和力更强的酶，几种经过修饰后的酶即使在较低的钙离子浓度条件下也能表现出很好的热稳定性。此技术经证实在淀粉加工业及用作洗涤剂淀粉酶都具有重要的意义。洗涤剂中的螯合剂使得在洗液中 Ca^{2+} 浓度较低，螯合剂甚至可以微弱地剥离结合在酶分子表面的 Ca^{2+}，从而使酶失活。

11.2.10　α-淀粉酶用于纺织品脱浆

现代纺织方法中对纺线施加了相当大的机械应力。为了防止纺线断裂，在纤维辫（并丝）上几乎总要涂上一种物质，该过程称作“上浆”（size）。上浆旨在纺织前强化纤维，用于上浆的物质必须具备的特征：与纺线有良好的黏附性，纺织后容易除去（纺织后必须除去上浆的物质，否则会阻碍后续正常的染色及漂白）以及廉价。人们已经将多种天然或合成的物质用于纺织上浆（见表 11.13）。淀粉是一种常用的上浆剂，因为其成本低、来源广泛。在欧洲常用马铃薯淀粉，而在美国和远东地区则分别多用玉米淀粉及米淀粉。

表 11.13　用于纺织品上浆的物质

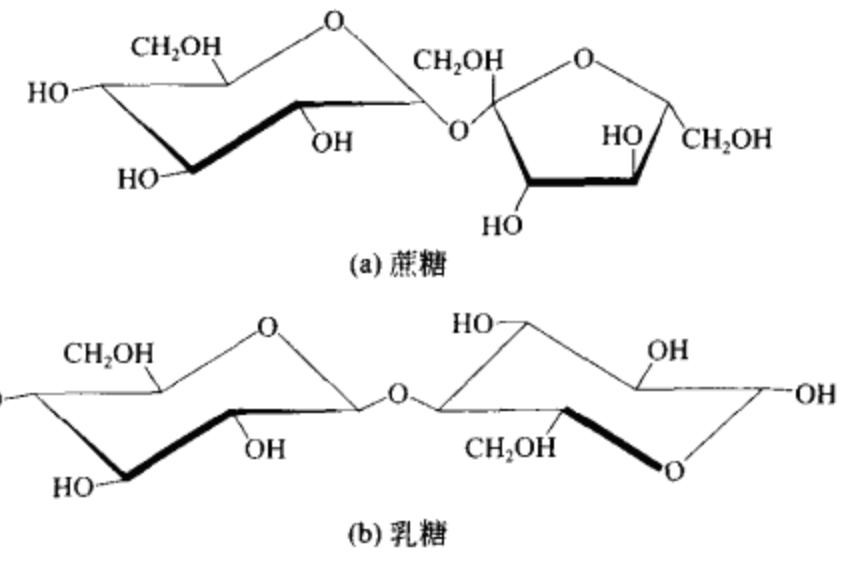
天然物质	合成物质	天然物质	合成物质
淀粉	甲基纤维素	瓜尔胶	聚乙烯醇
明胶	羧甲基纤维素	碳水化合物、大豆、肉类	甲基丙烯酸酯

随后可以通过加 NaOH 蒸汽加热或加氧化剂除去淀粉（即脱浆），但是这种方法会破坏织物的结构，并且产生的工艺废水需要处理。因而用 α-淀粉酶脱浆越来越广泛。一般主要用热稳定的细菌（即 *Bacillus licheniformis*）α-淀粉酶。在脱浆工艺中，人们根据酶浓度及环境参数的不同调节脱浆的时间，一般在几分钟到几小时。

与纺织品一样，纸张通常也需要用淀粉上浆。纸张通过上浆可以保护其在生产过程中免受机械损伤，也可以增强最终产品的硬度及手感（此时无需后续的脱浆）。天然淀粉的黏度太大，不能用作纸张上浆。通过 α-淀粉酶催化淀粉部分降解为具有合适黏度的产品用于纸张上浆，正日益受到重视。

11.2.11 乳糖酶和蔗糖酶

许多其他糖类降解酶在一些工业应用中也很重要。例如，乳糖酶（β-牛乳糖苷酶，图 11.15）可以催化乳制品中的主要糖分——乳糖水解生成葡萄糖和半乳糖。牛奶中一般含有 4.5%～5%的乳糖，乳糖水解收到关注有很多原因。可吸收乳中的乳糖在小肠吸收以前必须要水解成单糖。尽管婴儿肠道内的乳糖酶活性很高，但一些成人体内却缺乏这种酶。北欧的成人在其一生中身体都会产生较高的肠道乳糖酶活性。体内乳糖酶含量较少或根本没有乳糖酶的人属于乳糖酶偏执型，不能消化食用乳糖。当他们摄入乳糖时就会产生胃部不适及腹泻等症状。这种现象严重限制了乳制品作为许多成人人群的营养品。对乳制品中的乳糖进行预先的酶法水解可以解决这一难题，固定化乳糖酶已经成功地得到了应用。此外，不能消化乳糖的人可以在吃牛奶或乳制品之前先口服含乳糖酶的片剂。



(a) 蔗糖

(b) 乳糖

图 11.15　两种二糖的结构

干酪生产工业会产生大量副产品——乳清，很难处理。毫无疑问，乳清中含有大量乳糖，但其水解产物可作为食品或饲料工业的重要添加剂。乳糖的水解可以使得这种副产品成为一种有用的食品或饲料添加剂。乳清中的乳糖经过水解得到的糖浆甜度增加（但仅是蔗糖甜度的 70%）。由于单糖混合物的溶解性比完整的乳糖要好，从而更适于用作食品工业。乳糖水解物有时也用作冰激凌、甜食、烤焙食品及软饮料的配料。许多植物（如桃、杏）、微生物及哺乳动物都产生乳糖酶。市场上出售的乳糖酶是由 *Kluyveromyces leuti*、*Kluyveromyces fragilis* 或黑曲霉（*Aspergillus niger*）（表 11.14）生产的。曲霉乳糖酶用于酸性乳糖的水解，而 *Kluyveromyces* 乳糖酶可水解全乳（pH6.6）或甜乳清（pH6.1），水解过程

可用游离酶的批式系统或固定化酶实现。

目前使用的乳糖酶在 60℃以上不稳定，因此酶催化水解通常在低至 40℃的温度下进行。这样的温度下染菌就成为了一个很大的难题，尤其当乳制品成为底物时。在实际中乳制品在水解前通常先灭菌。因此过程的卫生以及生产周期间的管道和工艺设备，在乳糖的水解中就成为关键因素。最近，一些耐热的乳糖酶（如 *Thermus acquaticus* 乳糖酶，表 11.14）已经在各种重组表达系统中表达，这些耐热乳糖酶比目前工业上应用的乳糖酶更有吸引力。除了技术方面的考虑以外，过程的经济性在酶的大规模工业应用中也很重要。

表 11.14　乳糖酶的微生物来源及性质

来　源	最适 pH 值	最适温度/℃	分子质量/ku
Kluyveromyces lactis	7.0	35	135
Kluyveromyces fragilis	6.6	37	201
Aspergillus niger	3～4	55～60	124
A. oryzae	5.0	50～55	90
E. coli	7.2	40	540
Bacillus stearothermophilus	6～6.4	65	215
Thermos aquaticus	4.5～5.5	80	570

蔗糖酶在工业上也用于蔗糖的水解。糖果工业经常用酶形成一些软心糖中间的半固体填充物，它还被用于火腿、人造蜂蜜及小杏仁饼的工业生产。工业规模的淀粉酶通常来自于酿酒酵母（Saccharomyces cerevisiae）或曲霉（*Aspergillus*）的一些选育菌株。

11.3　木质纤维素降解酶

地球上大部分的糖类存在于植物生物质中。生物质是指一切生长的物质，植物生物质主要由三类聚合物组成：纤维素（40%）、半纤维素（33%）和木质素（23%）。通过光合作用植物生物质实现了永久再生，从而确保了这类物质的供应永不枯竭。据估计，高等植物每年合成 4×10^{10}t 的纤维素，这意味着每人每天占有超过 70kg 的纤维素。因此，纤维素降解酶显然受到了工业界的关注。

11.3.1　纤维素

纤维素是一种直链、非分支的多糖，它是由葡萄糖亚单位通过 β1→4 糖苷键连接而成。纤维素分子随聚合物的链长不同而有很大的不同，其中一些分子包括 3000～4000 个葡萄糖残基，而另一些含有 20000 个残基，大部分纤维素分子包括 8000～12000 个葡萄糖分子。每个葡萄糖分子相对于相邻的残基旋转 180°，因此，把这样重复的结构单元称为纤维二糖（图 11.16）。

纤维素的分子结构决定了它的性质，这种性质与同样由葡萄糖通过 α1→4 糖苷键相连构成的淀粉有很大的不同。由于连接键的 β 构型以及葡萄糖分子的空间重排，纤维素分子形成一种扩展的构象，单个纤维素分子进一步排列成纤维束或纤丝，纤维束或纤丝由几条平行的纤维素分子链构成，分子链通过分子间氢键形成的扩张网络定位。纤维素分子内部的葡萄糖

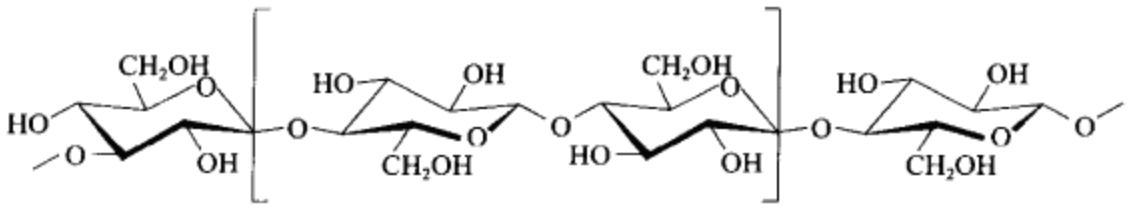


图 11.16 部分纤维素骨架的结构

每个葡萄糖分子通过 β1→4 糖苷键连接，后一个葡萄糖残基相对于前一个葡萄糖残基旋转 180°

残基似乎也以氢键结合，从而构成了分子在整体上的刚性。纤丝内部有一些扩展区（结晶区），具有高度有序的结构，结晶区是水不溶性的，对化学和酶法攻击具有很强的耐受性；收缩区（无定形区）的结构性较差。

脊椎动物没有水解纤维素 β1→4 糖苷键的内生酶，因此不能消化纤维素并将其作为营养源。一些微生物，尤其是真菌，能合成纤维素酶。反刍动物的消化系统内存在能水解纤维素的微生物，因此可以从纤维素中间接摄取营养。

11.3.2 半纤维素和木质素

纤维素是植物细胞壁的主要组分，它常与半纤维素、木质素等聚合物一起存在，很少单独存在。

半纤维素通常是一种低分子量多糖，主要由 D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、L-阿拉伯糖和 4-*O*-甲基-D-葡萄糖醛酸组成。细胞壁中含有的最丰富的半纤维素包括：葡聚糖、甘露聚糖和木聚糖。木聚糖是均聚物，由木糖残基通过 β1→4 糖苷键连接而成。

木质素是存在于高等植物中的一种复杂的芳香族聚合物，主要位于植物细胞壁上，散布在半纤维素之间。木质素与半纤维素混合物形成一种类似于混凝土的基底，纤丝有规则地嵌入其间。半纤维素与木质素的存在有助于增加细胞壁的整体结构强度。树干的木制部分含有20%以上的木质素。这些木质组织中，木质素存在于细胞之间，称为胞间层，胞间层起着胶黏剂的作用，将相邻的细胞黏合在一起。与纤维素或半纤维素不同的是，木质素不是多糖，它是主要由三个醇类亚单位组成的聚合物分子，这三个亚单位是：对香豆醇、松柏醇和芥子醇（图 11.17）。

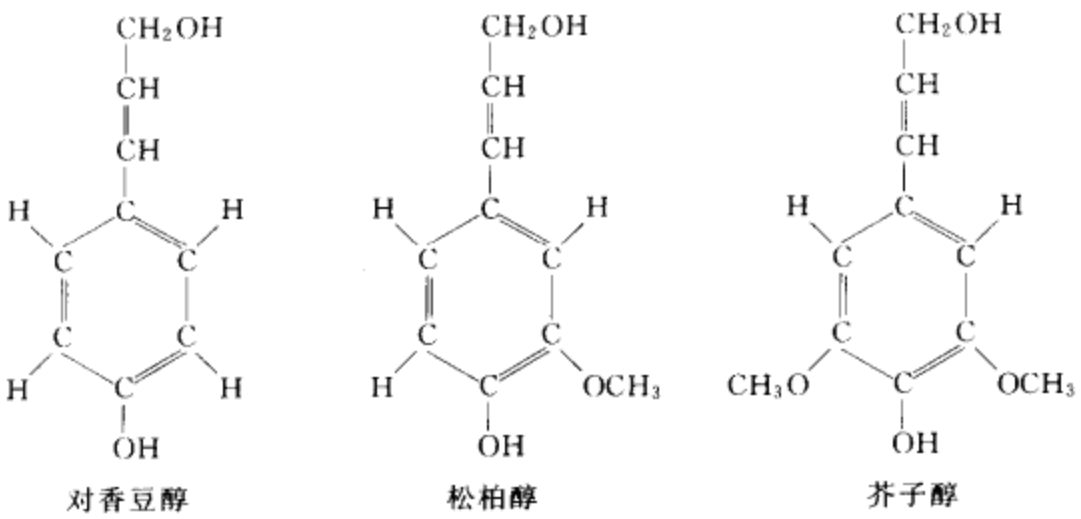


图 11.17 木质素中醇类分子的结构

这些醇类似乎通过随机交联形成高度分散的木质素分子。被子植物的木质素通常含有等量的松柏醇和芥子醇亚单位。而裸子植物的木质素主要是由松柏醇亚单位组成的，草的木质素则同时含有三种醇类亚单位。

11.3.3　纤维素酶

能够水解纤维素的酶叫做纤维素酶。对纤维素酶的正式研究可追溯到二战时期，当时美国军队记录了他们在南太平洋作战时遇到的一些纤维素材料（如衣服、帐篷等）快速变质的现象。研究表明，产纤维素酶的真菌是造成这一现象的元凶。

农业及家庭废弃物中含有大量的纤维素，木材与木浆中含有 40%以上的纤维素，稻草及甘蔗渣中含有 30%～50%的纤维素，而报纸中含有 80%以上的纤维素，棉花几乎全部由纤维素构成。因为纤维素经完全水解生成葡萄糖，所以任何能够有效、经济地催化纤维素完全水解为葡萄糖的工艺都具有重要的工业价值。

纤维素不能被单一酶降解，而是通过一系列酶以协同的方式催化降解。自然界中纤维素类材料降解速度较慢的原因如下：

① 几乎没有一种微生物能够产生完整的纤维素酶体系，将纤维素完全降解成葡萄糖；

② 纤维素纤丝中存在的单个纤维素分子有序的晶体结构，使得酶催化水解非常困难，而纤维素的无定形区降解较快；

③ 纤维素与半纤维素、木质素（有时是果胶）之间天然的紧密联系，进一步增加了纤维素酶降解纤维素的难度。

纤维素材料先要进行一些预处理，使纤维素分子更容易酶解。在工业规模上进行这些预处理，使得由纤维素生产葡萄糖不经济。纤维素水解酶可由许多微生物合成，最显著的是真菌（表 11.15），一些细菌也显示了降解纤维素的能力。

表 11.15　纤维素酶的微生物来源

真　菌	细　菌
Trichoderma viride	*Bacillus* spp.
T. reesei	*Cellulomonas* spp.
T. koningii	*Celluibro* spp.
Penicillium pinophilum	*Thermomonospora* spp.
P. funiculosum	*Clostridium thermocellum*
Sporotrichum pulverulentum	*Acetivibrio cellulolyticus*
Talaromyces emersonii	*Bacteroides cellulosolvens*
Sporotrichum thermophile	*Bacteroides succinogenes*
Humicola insolens	*Ruminococcus albus*
Chaetomium thermophile	*R. flavefaciens*

11.3.4　真菌纤维素酶

真菌纤维素酶受到的关注最多。真菌中主要是 *Trichoderma* 属，如 *T. viride*，*T. reesei*，*T. koningii*，以及 *Penicillium funiculosum*，生产的纤维素酶至少能够部分降解天然纤维素的结晶区。

真菌生产的大多数纤维素水解酶可以归到下列三类之一：①纤维素内切酶（β1→4-D-葡聚糖内切酶，常简称为纤维素酶）；②纤维二糖水解酶；③β-葡萄糖苷酶。所有可以降解纤维素的真菌产生了这三种酶各自的多种形式（multiple form），一些多种形式的遗传学特性各异，而另一些来源于一种蛋白质的部分蛋白水解或差异糖基化。这些不同的纤维素水解酶联合作用，就能够溶解纤维素底物。

纤维素内切酶（葡聚糖内切酶）催化纤维素分子内部的随机水解。6 种纤维素内切酶的活性都与真菌有关。纤维素内切酶主要水解纤维素分子中的无定形区，对结晶纤维素的水解活性较低。

纤维二糖水解酶通常从纤维素分子的非还原末端依次水解纤维二糖结构单元，此外，β-葡萄糖苷酶能水解来自纤维素分子的短链寡糖和纤维二糖，产生葡萄糖单体分子。许多纤维二糖水解酶受产物抑制，它们的活性随纤维二糖的浓度增加而降低，但 β-葡萄糖苷酶的活性可以消除这种抑制作用。

11.3.5 细菌纤维素酶

许多好氧菌、厌氧菌都可以生产纤维素酶。分解纤维素的细菌主要产生纤维素内切酶，只有较少的种能产生纤维二糖水解酶。有些能产生 β-葡萄糖苷酶，但这些酶通常滞留胞内。某些细菌亚类（最著名的是 *Clostridium* 属，能降解高度结晶的纤维素）能产生高分子量的酶复合体，称为纤维聚糖酶。这种纤维素糖酶通常由几种葡聚糖内切酶和几种葡聚糖外切酶组成，这些酶通过一些较短的序列（停靠域，docking domain）与一个较大的非催化蛋白（脚手架亚基，scaffolding subunit）结合。这种高度有序的结构，使其降解纤维素物质更加有效。这些纤维聚糖酶可能锚定在产生菌的表面，因此要求这些菌停靠在纤维素表面，以便引发底物的水解（图 11.18）。

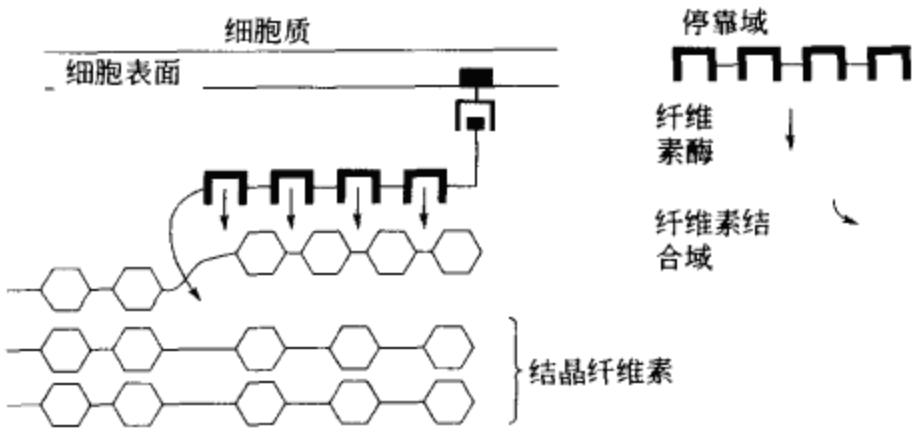


图 11.18 细菌纤维素酶体的一般公认结构

连在停靠平台上的纤维素结合域与纤维素微纤丝中的纤维束结合，扰乱了后者的晶体结构，使得纤维素伸展，并可以被纤维素酶体的多种纤维素分解活性所作用。详见正文

11.3.6 纤维素酶的结构

许多纤维素内切酶或一些纤维素外切酶经过有限的蛋白酶解，生成两种蛋白质组分：一个能与纤维素结合（纤维素结合域）；另一个是催化域（图 11.19）。不是所有的纤维素酶都有结合域，而且含有结合域的酶的三维结构与大小也不相同。通过将纤维素酶定向于底物上，

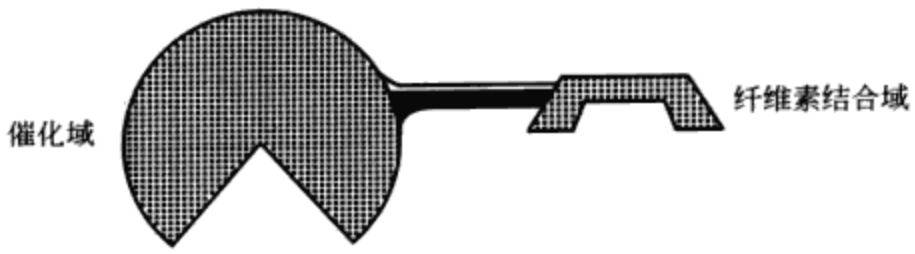


图 11.19　纤维素酶的结构简图

纤维素结合域有助于对纤维素进行更有效的水解。纤维素结合域通过一个较短的连接序列与酶的催化域连接。就已经研究的纤维素酶来看，这一连接序列的长度为 6～59 个氨基酸残基，它富含脯氨酸和羟基化氨基酸，通常是高度糖基化的。基于一定长度氨基酸序列的催化域，在不同的纤维素酶中变化很大。不变的是，催化域比结合域大得多，其在纤维素酶中的含量为 70%甚至更多。

这里对于纤维素水解的总结有些过于简单了，实际上该聚合物的酶法降解是十分复杂的，而且对于这一过程究竟需要几种酶以及每一种酶在整体降解过程中所起的确切作用尚存在争论。人们对细菌纤维素酶系统的了解比对真菌的更少。

11.3.7　纤维素水解的工业应用

纤维素酶及其相关酶的工业应用很多。由纤维素生产的葡萄糖可直接应用于人及动物的食物中，葡萄糖也可以作为随后的发酵或其他工艺的底物，制得一些有价值的最终产品，如乙醇、甲醇、丁醇、甲烷、氨基酸、有机酸、单细胞蛋白等。纤维素水解酶也可以直接用来提高高纤维含量的食物的可吸收性，改善食品的味道、结构及其他性质。

除了上述用途以外，纤维素酶也有以下应用：

① 洗涤剂中的添加剂；

② 砂洗粗斜棉布；

③ 从水果中提取果汁的最大化（与果胶酶一起使用）；

④ 果汁的澄清（与果胶酶一起使用）；

⑤ 在生产发酵豆制品时除去大豆外皮；

⑥ 改善汤粉和菜干的再水合作用；

⑦ 动物饲料添加剂（第 12 章）；

⑧ 青贮饲料制作中的添加剂；

⑨ 海藻胶凝的添加剂。

上述应用范围有限，既有技术方面的难题，又有经济方面的原因。如前所述，降解纤维素的生物体合成了非常复杂的纤维素水解酶系统。在大多数情况下，对纤维素降解的分子机理的了解还很有限。纤维素分子的结晶重排为纤丝，以及其他聚合物（如木质素、果胶和半纤维素）与纤维素的紧密连接，都大大地阻碍了酶法降解过程。有效的水解需要进行昂贵的预处理，以及纤维素水解酶生产的高成本，进一步降低了酶法水解在经济上的可行性。大多数野生菌只能生产较少的纤维素酶，而且酶的专一性也不能令人满意。诱变法得到了高产量的菌株，但其专一性仍然较差。许多纤维素酶会被其催化形成的产物所抑制，这种抑制作用进一步降低了降解速率。

商品化的纤维素酶来自真菌，如 *Trichoderma longibrachiatum*，*Humicola insolens*；

商品化的细菌纤维素酶一般来自杆菌（bacilli）。专一性的重组纤维素内切酶也已经得到应用，主要用在洗涤剂工业和纺织工业，如下文所述。

11.3.8 用作洗涤剂

20 世纪 80 年代末，纤维素酶在日本被首次加到洗涤剂中，在 90 年代这一方法相继被欧洲和美国所效仿。尽管有几种纤维素酶经证实在碱性 pH 值下有活性，而且在典型的洗涤剂配方中稳定，但不是所有的纤维素酶都具有用作洗涤剂的物理化学性质。表 11.16 列出了用作洗涤剂的主要纤维素酶。

日本 KAO 公司通过一系列的筛选程序鉴定了一种来自碱性 *Bacillus*（*Bacillus* KSM-635）的耐受洗涤剂的纤维素酶。应用离子交换色谱和凝胶过滤色谱进行纯化得到两个纤维素酶（葡聚糖内切酶）峰，其分子质量分别为 130ku 及 103ku，在 40℃、pH 9.5 时有最大活性，在 pH 6～11 范围内温育时保持稳定，纤维素酶对多种表面活性剂、螯合剂稳定，受 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 抑制，保持热稳定性需要 Co^{2+}、Ca^{2+}、Mg^{2+} 或 Mn^{2+}。Novo Nordisk 公司的纤维素酶产品 Celluzyme（表 11.16）来源于嗜热性真菌 *Humicola insolens* DSM1800，该产品包括一系列葡聚糖内切酶、纤维二糖水解酶和 β-葡萄糖苷酶。Novo Nordisk 公司的产品 Carezyme（表 11.16）是从 *H. insolens* 中分离到的葡聚糖内切酶，但是其基因在米曲霉（*Aspergillus oryzae*）工程菌中加以表达。

表 11.16 主要洗涤剂纤维素酶的来源、特征及工业制造商

名　称	公　司	来　源	pH 范围	温度/℃
KAC	KAO Corp. Japan	嗜碱 *Bacillus* sp.	7～10	40(最适温度)
Celluzyme	Novo Nordisk	*Humicola insolens*	7～9	50(最高温度)
Carezyme	Novo Nordisk	重组 *Humicola insolens* 外切酶	10	50(最高温度)

洗涤剂中的纤维素酶有多种作用，包括去除污点、色素，脱球（depilling）和软化织物。在纤维素类织物（棉/棉混纺，人造纤维，亚麻）中通过纤维素的有限水解达到上述效果。显然，棉织物污点中的污物分子会被微纤丝的无定形区截留，从而使得有效去除它们十分困难。洗涤剂中的纤维素酶会部分裂解纤维中无定形区的纤维素分子，从而使得污物更容易去掉，而且不会造成棉织物的大量降解。

去除色素、脱球和软化织物都是基于相同的效应。衣物的重复穿戴与洗涤，会对棉纤维造成一定的损伤，结果微纤丝会从光滑的棉纤维表面突起。颜色亮度下降，颜色亮度有赖于色素的漂白。显然是因为不平整的棉纤维表面散射入射光，所以衣物表面发暗。用纤维素酶处理可以除掉这些损坏的微纤丝，从而使纤维表面重新光滑。显然，微纤丝锚点处的机械损伤会使得该区域更容易受到纤维素酶的作用。

颜料的去除及纤维的软化也是同样的道理。重复穿着和洗涤衣物会对纤维造成机械损伤，微纤维会从原来光滑的纤维表面暴露出来，从而降低了衣服的光泽度。用纤维素酶处理被破坏的纤维能够使纤维表面重新光滑（这表明前端机械损伤的微纤维更易于水解）。

正在发生的机械损伤使得微纤丝聚集形成被称为球粒的小球。纤维素酶能水解纤维表面球粒的锚点，产生一种脱球效应。除去微纤丝，防止单个纤维的联锁，从而改善了织物的质地和手感。这个过程就是织物软化。

11.3.9　砂洗和生物抛光

纤维素酶可应用于纺织工业，促进粗斜棉布的砂洗和棉织品的生物抛光。砂洗处理后粗斜棉布会看起来更旧，呈现粗糙的外观。传统的砂洗过程是将棉布放入含有浮石的水中洗涤，通过机械摩擦的作用达到砂洗效果。纤维素酶可以替代浮石，达到类似的效果。纤维素酶的使用可以减少对洗涤机器的机械损伤，不需要浮石，使得一个操作周期可以洗涤更多的粗斜棉布。粗斜棉布染色时（尤其是用靛蓝染色），大部分染料分子附着在粗斜棉布纱线表面。纤维素酶的使用可以催化纤维素纤维部分水解，释放出一些色素，使处理后的棉布呈现磨损或褪色的外观。

生物抛光过程是指使用纤维素酶来处理新棉织品，旨在除去新棉织品表面变松或突出的微纤丝，使纤维变得尽可能光滑，延缓起球，延缓脱色，在长时间穿着后仍显得很新。

11.3.10　酶催化脱墨

人类活动对环境的影响，受到越来越多的关注，对尽可能地回收污染物起到了推动作用。其中一个重要的例子就是废纸的回收和再利用。据估计，在美国，大约 50%的废纸得以回收利用。要想重新利用废纸，就必须除掉纸料上的墨汁。一些纸上的墨汁很容易去掉（如报纸使用的油墨），但大多数纸张的脱墨是不容易的。脱墨过程包括将墨汁颗粒从纸纤维表面去除，然后通过洗涤使脱下来的墨汁与纤维分离。这个过程可以通过化学方法实现，但会产生废物排放，需要认真的处理。酶催化脱墨则较为环保经济，脂肪酶可以降解从而去除植物油墨。另一些合成墨汁则难以通过酶法降解。这些合成油墨则需要用纤维素酶（有时也用纤维素酶及半纤维素酶的混合酶）降解，这些酶部分水解纤维素和半纤维素纤维，释放纤维表面附着的墨汁分子，进而促进脱墨。

11.4　果胶与果胶酶

果胶是高等植物中发现的另一种结构性多糖，主要存在于细胞壁及胞间层，起到结合相邻细胞的作用。多种能降解果胶的酶已经从植物和微生物中分离得到。果胶的降解对植物细胞的生长和果实的成熟有重要作用。微生物果胶酶（主要由真菌产生）已经用在大规模的工业化过程中。重组 DNA 技术推动了编码果胶酶的基因的确定、克隆和测序，并使它们能在异源体系中表达。

11.4.1　果胶

果胶是一类相当多样的多糖，其组成和分子量变化很大。半乳糖醛酸是组成果胶最主要的分子，在有些果胶中含量可达到 60%～80%。果胶中经常包含的其他糖类有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和木糖（图 11.20）。

完整的未成熟植物组织中存在的果胶分子，通常称为原果胶。似乎因为其高分子大小以及与钙离子或其他二价阳离子结合，所以原果胶是不溶于水的。所有其他果胶都是溶于水的，从原果胶水解而产生。果胶可以被看作主要是由半乳糖醛酸组成的多糖，至少 75%的半乳糖醛酸都是甲

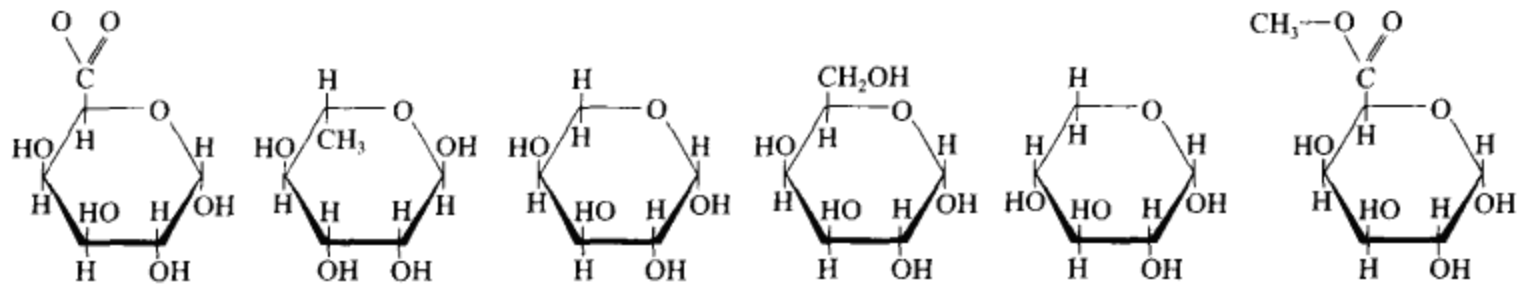


图 11.20　果胶中常见单体的结构

天然果胶中，75%或75%以上的半乳糖醛酸与甲醇酯化，形成半乳糖醛酸甲酯

酯化的。对这些半乳糖醛酸酯进行脱酯，从而生成一种被称为果胶酸的物质。果胶类物质通常可以分为半乳糖醛聚糖、鼠李半乳糖醛聚糖、阿拉伯聚糖、半乳聚糖和阿拉伯半乳聚糖。

鼠李半乳聚糖代表着果胶中的主要组分，这种多糖的骨架，主要由 α-D-半乳糖醛酸结构单元通过 α1→4 键连接而成。L-鼠李糖分布于骨架之中，分布间隔为 25～30 个半乳糖醛酸结构单元。鼠李糖结构单元通过 β1→2 键或 β1→4 键与 D-半乳糖醛酸残基相连。不同长度的侧链（通常由半乳糖醛聚糖、半乳聚糖、阿拉伯聚糖或阿拉伯半乳聚糖构成）从主链上分出来（图 11.21）。

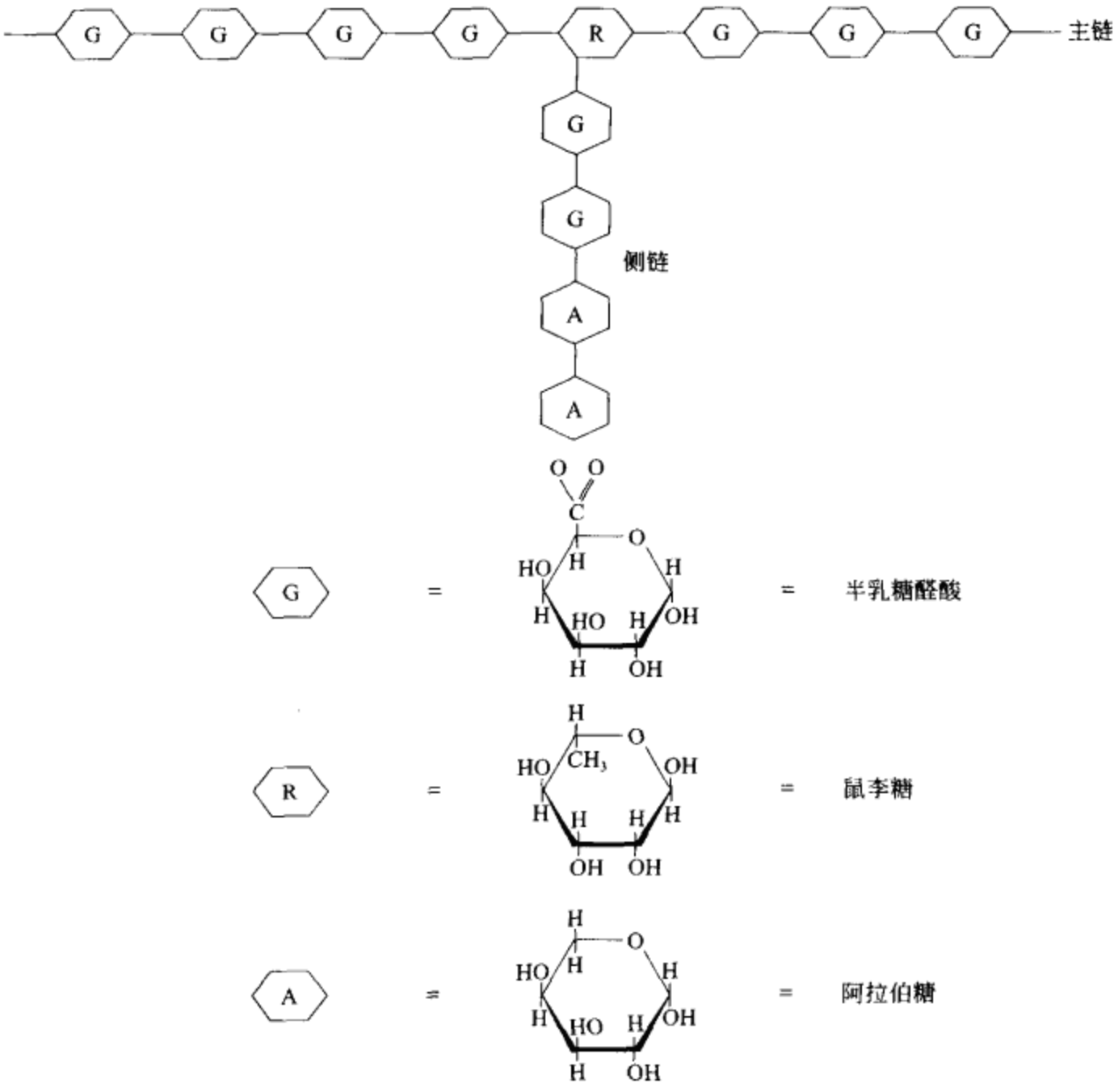


图 11.21　鼠李半乳聚糖片段的结构

片段包含高密度的侧链（称之为“发状区”），这些发状区一般与侧链以外的伸展序列（称之为“平滑区”）相分离

11.4.2　果胶酶

果胶酶分为两大类：一类是果胶酯酶，也叫做果胶甲酯酶；另一类是解聚酶。果胶甲酯酶的作用是将甲氧基从甲酯化的半乳糖醛苷上去除。所有高等植物中都含有果胶酯酶，在柑橘果实及蔬菜中含量尤为丰富。人们在大量的微生物（尤其是真菌）中也发现了这种酶。

解聚酶的作用是通过水解（水解酶）或 β-消除（裂合酶）来裂解糖苷键。很多情况下，先是果胶酯酶催化去除糖苷上的甲氧基，随后解聚酶发挥作用。

多聚半乳糖醛酸酶可以催化 β-半乳糖醛酸之间的 α-1,4 键水解。高等植物及微生物体内多种不同的多聚半乳糖醛酸酶活性已经被鉴别。多聚半乳糖醛酸内切酶可以催化聚半乳糖醛酸片段分子内部的 α1→4 糖苷键水解，由于裂解位点是随机的，所以产生了许多低分子量的寡糖。这一过程需要用果胶甲酯酶先除去甲氧基。多聚半乳糖醛酸外切酶从聚半乳糖醛酸的非还原末端依次催化去除半乳糖醛酸残基。

裂合酶是一种降解果胶的解聚酶，几乎全由微生物产生，能通过 β-消除催化裂解连接半乳糖醛酸残基的 α1→4 糖苷键。在除去甲氧基以后，果胶裂合内切酶可以催化聚半乳糖醛酸内部糖苷键的裂解，该酶分离自植物微生物病原体中，具有较高的最适 pH 值，需要钙离子存在以维持活性。

果胶裂合外切酶主要由细菌产生。大部分这种酶可以催化半乳糖醛聚糖倒数第二个糖苷键水解，产生半乳糖醛酸二聚体分子。有些果胶裂合外切酶可以裂解末端糖苷键，产生一分子的半乳糖醛酸。与果胶内切酶相比，大多数果胶外切酶倾向于攻击不带甲氧基团的聚半乳糖醛酸。这些酶主要是由真菌产生的，通常催化内部糖苷键的随机水解，产生酯化的寡半乳糖醛酸。

11.4.3　果胶及果胶降解酶的工业价值

果胶已经得到了广泛的工业应用，因为果胶的水溶液黏度比较大，在酸性条件下加糖加热就会很容易成胶，从而使得果胶用作很多食品工业的胶凝剂、乳化剂和增稠剂。用于这些方面的果胶分为高甲氧化果胶及低甲氧化果胶。就像名字中提到的，高甲氧化果胶中大部分糖醛酸残基是甲氧化的；在低甲氧化果胶中，很多甲氧基团被去除了。低甲氧化果胶的成胶作用需要加入某种金属离子来实现，即使有糖存在；而高甲氧化果胶的成胶需要大量的糖。低甲氧化果胶使得生产含糖量低的果汁及果冻成为可能。商用果胶主要从柑橘果实外壳或甜菜废粕中提取得到，这两种原料都富含果胶。

果胶酶用于很多工业过程，尤其是果汁提取和澄清工业。果汁是水果经机械压榨制成，在许多情况下，水果的物理性质妨碍了果汁提取的最大化，但加入商业果胶酶制剂就可以大大提高果汁的产量。

真菌果胶酶制剂经常用于从苹果及葡萄中最大化提取果汁。从大多数软水果（如树莓、草莓和黑莓）中提取果汁，可以通过加入外源果胶酶提高产率。

商业果胶酶制剂一般用于透亮果汁的澄清，如苹果汁、梨汁。大部分新榨成的果汁中含有较多的可溶性果胶，这些果胶造就了榨成果汁的黏度和浊度。浊度的形成说明果汁中某种组分或多种组分（与果胶相关的组分）的溶解度降低。但通过加入商业果胶酶制剂部分水解

果胶，可以使产品黏度明显下降。而且果胶部分水解后，浑浊颗粒会变得不稳定，从溶液中凝结和沉淀，随后通过离心和过滤等方法除去沉淀物，便可获得透亮和澄清的果汁。所以果胶酶处理可以降低溶液的黏度，使得生产浓缩果汁成为可能。

果胶酶制剂也用于水果或蔬菜的浸渍，浸渍作用是通过选择性水解胞间层的果胶，将水果或蔬菜组织转化为悬浮的单个细胞。浸渍通常采用具有高水平多聚糖醛酸酶活力的商业果胶酶制剂来实现，该酶直接加到熟成期间的水果软化工序中。酶法浸渍可以用于生产带果肉饮料和一些婴儿食品。果胶酶还可以用于从橘子和柠檬皮中提取多种柑橘油和色素。

最常见的果胶酶制剂是由真菌（如曲霉和青霉）生产的。果胶原料（如苹果渣、柑橘皮和甜菜废粕粉）一般混在发酵培养基中，用于培养生产果胶酶的真菌。这些原料不仅可以强化果胶酶的生产，而且会促进酶从菌丝体中分泌。产生的酶通常通过沉淀的方式浓缩和部分提纯，随后加入稳定剂、保护剂和其他添加剂，制成最终的酶制剂，以液态或固体形式进入市场销售。商业果胶酶制剂通常具有很多降解果胶的活性，大部分酶制剂含有相当多的其他酶，如纤维素酶和半纤维素酶。

11.5 进一步的阅读材料

图书

Amylase Research Society of Japan (1988) *Handbook of Amylases and Related Enzymes*. Pergamon Press, Oxford.

Barrett, A. *et al*. (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London.

Beynon, R. (2000) *Proteolytic Enzymes*. Oxford University Press, Oxford.

Bott, R. (1995) *Subtilisin Enzymes*. Plenum Publishing Co., New York.

Claeyssens, M. (1998) *Carbohydrases from* Trichoderma reesei *and other Microorganisms*. Royal Society of Chemistry, London.

Fogarty, W. (1990) *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Elsevier, Amsterdam.

Gerhartz, W. (1990) *Enzymes in industry: production and applications*. VCH, Weinheim.

Godfrey, T. & West, S. (1996) *Industrial Enzymology*, 2nd edn. MacMillan, Basingstoke.

Himmel, M. (2001) *Glycosyl Hydrolysases in Biomass Conversion*. American Chemical Society.

Tsao, G. (1999) *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*. Springer-Verlag, Godalming.

Uhlig, H. (1998) *Industrial Enzymes and their Applications*. Wiley Interscience, New York.

Wiseman, A. (1995) *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Ellis Horwood, Chichester.

Yamamoto, T. (1995) *Enzyme Chemistry and Molecular Biology of Amylases and Related Enzymes*. CRC Press, Boca Raton.

论文

蛋白酶

Bryan, P. (2000) Protein engineering of subtilisin. *Biochem. Biophys. Acta-Prot. Struct. and Mol. Enzymol.* **1543** (2), 203-222.

Daneil, R. & Toogwood, H. (1996) Thermostable proteases, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13**, 51-100.

Rao, M. *et al.* (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** (3), 597-635.

Siezen, R. & Leunissen, J. (1997) Subtilases: The superfamily of subtilisin-like proteases. *Protein Sci.* **6**, 501-523.

Siezen, R. *et al.* (1991) Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin like proteinases. *Protein Eng.* **4** (7), 719-737.

糖酶

Bertoldo, C. & Antranikian, G. (2001) Amylolytic enzymes from hyperthermophiles. *Hyperthermoph. Enzymes, A* **330**, 269-289.

Bhosale, S. *et al.* (1996) Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. Rev.* **60** (2), 280-300.

Gekas, V. & Lopez-Leiva, M. (1985) Hydrolysis of lactose: a literature review. *Proc. Biochem.* **Feburary**, 2-12.

Guzman-Maldonado, H. & Paredes-Lopez, O. (1995) Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35** (5), 373-403.

Hashida, M. & Bisgaard-Frantzen, H. (2000) Protein engineering of new industrial amylases. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **12** (68), 389-401.

Himmel, M. *et al.* (1999) Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10** (4), 358-364.

James, J. & Lee, B. (1997) Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology-a review. *J. Food Biochem.* **21**, 1-52.

Kashyap, D. *et al.* (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technol.* **77** (3), 215-227.

Lang, C. & Dornenburg, H. (2000) Perspectives in the biological function and the technological applications of polygalacturonases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53** (4), 366-375.

Nielsen, J. & Borchert, T. (2000) *Biochemi. biophysi. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1543** (2), 235-274.

Ohmiya, K. *et al.* (1997) Structure of cellulases and their applications. *Biotechnol. Genet, Eng. Rev.* **14**, 365-407.

Prade, R. (1996) Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13**, 101-132.

Prade, R. *et al.* (1999) Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. *Biotechnol. Genet, Eng. Rev.* **16**, 361-391.

Savchenko, A. *et al.* (2001) Alpha-amylases and amylopullanase from pyrococcus furiosus. *Hyperthermoph. Enzymes A* **330**, 354-363.

Schulein, M. (2000) Protein engineering of cellulases. *Biochem. Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1543** (2), 239-252.

Singh, A. & Hayashi, K. (1995). Microbial cellulases, structure, molecular properties and biosynthesis. *Adv. Appl. Microbiol.* **40**, 1-39.

(张艳　译　　谭天伟　校)

第12章

其他一些工业酶

12.1 脂 肪 酶

脂肪酶是能催化脂类的水解，生成甘油和脂肪酸的酶。该反应通常是可逆的（图 12.1）。

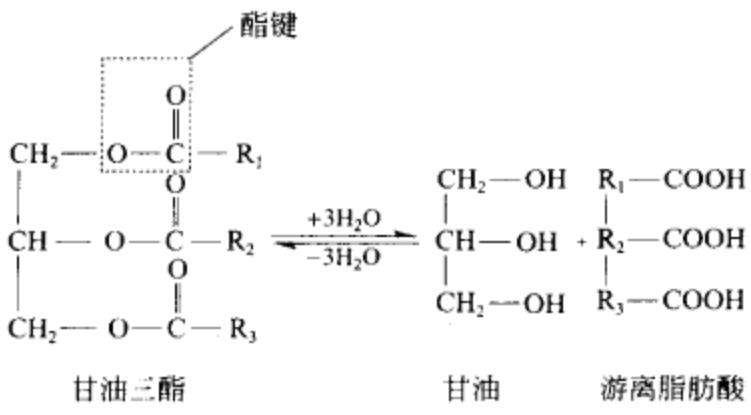


图 12.1 脂肪酶催化的反应

它们在水溶液中对可溶性底物几乎很少甚至不表现活性。相反它们只有在水-底物（如脂类）界面表现出活性，一种称为界面活化的过程。广泛来自于各种哺乳动物、植物、真菌、酵母和细菌的脂肪酶都获得了纯化。其中有几种的三维空间结构已被阐述。这些酶的分子质量通常在 20～60ku 的范围，而且尽管序列同源性相对较低，它们均有相似的三维空间结构。例如，它们显示了一个典型的 α/β 水解酶折叠，酶的核心包含一个由 8 个 β 结构的延展（stretch）组成并用 α 螺旋片段连接的 β 片。

脂肪酶通常被称为丝氨酸水解酶，因为它们的催化三分体与丝氨酸蛋白酶有些类似。脂肪酶的三分体通常由丝氨酸和组氨酸残基连同一个天冬氨酸或谷氨酸残基组成。活性位点形态有所不同，因为它被一大片疏水区域所包围。整个区域依次被保护或由一个盖子似的由极性（带电，如亲水性）氨基酸残基组成的多肽环覆盖。这些“盖子”的存在可能就解释了为何在水中脂肪酶对可溶性底物不显活性。当酶与脂类界面接触就产生了一个构象的变化，导致活性位点能自由地到达底物分子（如图 12.2），因此也解释了前述的界面活化现象。

对脂肪酶的工业需求在过去 20 年稳定地增长，保守估计脂肪酶在工业酶销售中已占了 7%。脂肪酶的单一最广泛应用是用作洗涤剂的内含物。脂肪酶也应用在食品工业、有机合成和纸张、纸浆处理工业中。商业脂肪酶的来源通常包括假丝酵母、假单胞菌和根霉的各种菌种，另外一些商业制剂来源于枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、黑曲霉（*Aspergillus niger*）、毛霉菌、腐殖菌和青霉菌等。以前一些商业脂肪酶是从来自自然生物中直接提取而

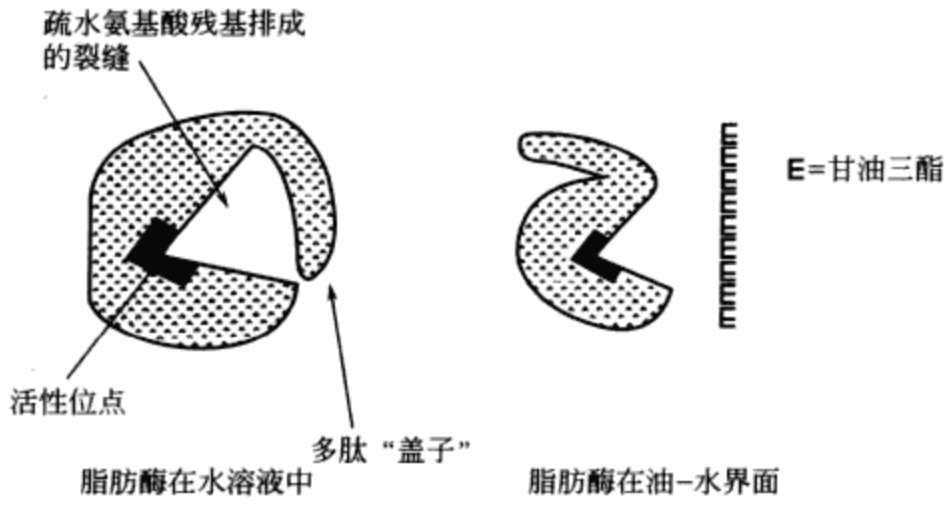


图 12.2　脂肪酶附着在油-水界面上构象发生改变使活性位点与底物结合

详见正文

制得。现在重点已放在从重组菌种生产，原因是该酶在自然生物中表达水平较低。

12.1.1　洗涤剂中的应用

脂肪酶在洗衣工业的最早应用记录可追溯到 1913 年，当时 Rhom 将胰腺提取物加入到洗涤剂中。但是表面活性剂和洗涤剂的添加成分会抑制胰腺酶类的活性，直到 20 世纪 70 年代研究人员才确认应用于洗涤剂的合适脂肪酶。现在主要的洗涤剂脂肪酶是通过重组手段生产的（如表 12.1）。

表 12.1　主要的商用洗涤剂的来源及制造商

酶的商标名称	制　造　商	脂肪酶的基因来源	脂肪酶的基因表达
Lipolase	Novo Nordisk	*Humicola lanuginosa*	*Aspergillus oryzae*
Lipomax	Gist Brocades	*Pseudomonas alcaligenes*	*Pseudomonas alcaligenes*
Lumafast	Genencor	*Pseudomonas mendocina*	*Bacillus* sp.
Lipolase Ultra	Novo Nordisk	lipolase 的蛋白质工程变异体	
Lipo Prime	Novo Nordisk	lipolase 的蛋白质工程变异体	

脂类污垢（表 12.2）长期以来被认为是最难以从脏衣服上除去的污垢类型。过去这些污垢在高温下能较好地除去。而追求更柔和清洗条件（20～40℃）的趋势使有效除去脂类更加困难。洗涤剂脂肪酶能催化降解水不溶性油脂污垢，产生较多的诸如单甘油酯、双甘油酯、脂肪酸和甘油等可水溶性物质。这些分解产物通过放在清洗液中进行清洗就能更容易除去。

表 12.2　常见的在脏衣物上的油脂污垢

源自食品	源自身体	源自化妆品
黄油和脂肪	皮脂	口红
食用油	汗液	染眉毛油
巧克力		
色拉调味料		
蛋黄酱		
意大利面调味料		

少量的洗涤剂相容性脂肪酶作内含物（通常占全部洗涤剂的 0.1%）就能有效除去油脂污垢。但是清洁效果在第一次清洗后不会明显，而油脂污垢只有在随后的一次（或多次）的

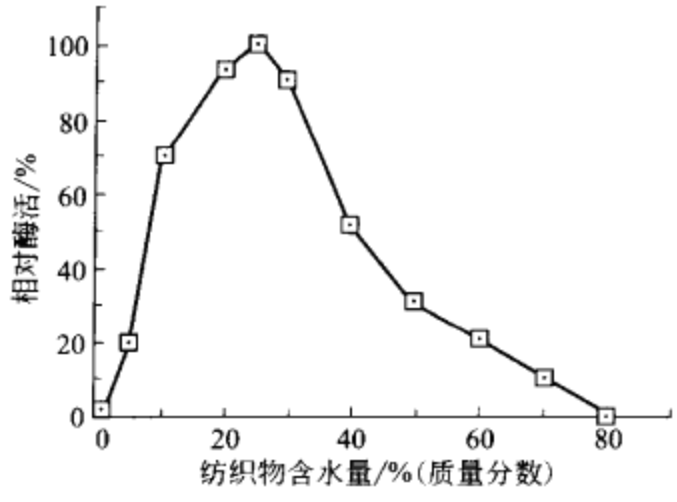


图 12.3 纺织物水含量对洗涤剂脂肪酶"Lipolase"活性的影响

清洗循环后才能彻底除去。这就是复合循环效应。这是因为脂肪酶在湿透的纺织物中通常活性较低，最大的酯解活性（除垢能力）在纺织物的拧干和晾干过程中出现，这时纺织物中的水含量下降到10%～40%（质量分数）（如图 12.3）。结果在第一次清洗后大部分的油脂分解物仍留在纺织物中，只有在随后的清洗过程中才能除去。

像其他洗涤剂酶类一样，各种脂肪酶已成为蛋白质工程的课题，尝试发展更有效的产品。这些实验的目标包括增加酶在洗涤剂组分存在的情况下的稳定性，增加其特异活性或扩展其底物特异性（使之能降解更多的油脂污垢）。在一些情况下采用非特异性方法，如替换了酶活性位点上或附近的各种氨基酸，通过测定酯解活性的变化来筛选变异体。一种商业脂肪酶（Lipomax，表 12.1）就是通过该途径确定的。发现用亮氨酸替换了 21 位上的甲硫氨酸后明显提高了清洗效果。体外研究显示这种替换增加了酶的特异活性达 50%以上。

更多脂肪酶蛋白质工程的特异性方法已经产生商业产品。油脂污垢被认为带有净负电荷（由于脂肪酸和负离子表面活性剂连接在污垢表面）。因此如用中性（或正电荷）氨基酸替换负电荷氨基酸将能减少电荷排斥性提高酶与污垢的结合。Novo 公司的研究人员发现将 *H. lanuginosa* 脂肪酶（Lipolase）的 96 位点天冬氨酸残基替换为亮氨酸残基，获得了具有更高清洗能力的一种工程脂肪酶。该产品随后就以商品名 Lipolase Ultra（见表 12.1）开始销售。

12.1.2 其他应用

组分三甘油酯的含量和结构对食品的营养、香味和味道有主要影响。研究发现脂肪酶能用于某些食品香味的改变和产生。如酶修饰的干酪，是通过控制传统干酪的蛋白质水解和酯解获得的，香味丰富的肽和游离脂肪酸的生成，使产品带有诱人的香味。奶油能通过脂肪酶的处理转化为脱脂乳脂。游离脂肪酸混合物产生一种非常强烈的类似奶油和黄油香味的产品，能加入到各种产品中使它们增香。

在纸浆和造纸工业中脂肪酶的应用也越来越多，脂肪酶用来除去沥青。"沥青"用于描述木材中的疏水成分的术语。它在松木和其他软木中非常普遍，占了木材质量的 0.5%～3%。"沥青"由甘油三酯和蜡状物组成，这些物质使木材具有黏性，在纸张制造中会带来严重的加工问题。一些"沥青"能通过制浆和化学漂白过程除去。另一个选择办法是使用脂肪酶使它酶解。源自圆柱假丝酵母（*Candida cylindracea*）的脂肪酶在这方面有最多的应用，该酶已经商业应用在一些纸张生产商中。

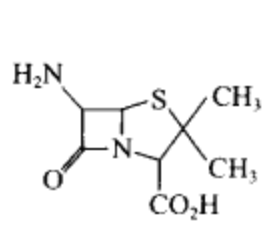
脂肪酶在有机合成中也具潜力，在这方面酶的立体特异性是最主要的优点，特别是生产一些药物产品和中间体。许多医疗中的药物是直接化学合成的。如果合成的组分含有一个手性中心，通常会产生一个外消旋混合物（相同数量的 D-异构体和 L-异构体）。通常只有一种异构体具有所需的生物效应，另一种无生物活性。但在一些情况下，另外的异构体会产生负作用而且必须在最后产物中除去。酶能潜在地用于分离异构体或选择性地合成所需的异构体（同样见于氨基酰化酶的分泌）。例如，脂肪酶在卡托普利（captopril）中有应用的潜力，卡托普

利是一种血管紧张肽转化酶的抑制剂。尽管脂肪酶在手性化合物的生产和分解中具有潜力的同时，但迄今只有极少数此过程能商业化。

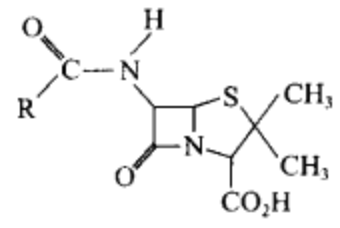
12.2　青霉素酰化酶

青霉素的发现在治疗细菌引起的疾病方面是一项革命性的突破。随之而来的是，一大批显示抗菌活性的其他化合物已经被引入了临床领域。青霉素和结构相关的头孢霉素是医疗机构使用最普遍的抗生素。随着时间的推移已经证实越来越多的菌种对青霉素显示出了耐药性，而半合成青霉素的发展已经部分抵消了这种耐药性，许多耐药菌株对其很敏感。青霉素酰化酶在半合成青霉素的生产上起了至关重要的作用，因此是极有意义的工业酶。

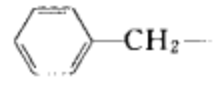
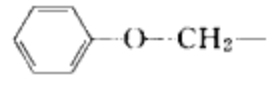
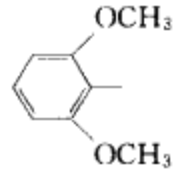
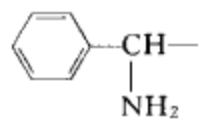
一些天然青霉素和半合成青霉素的化学结构如图 12.4 所示，所有的都包含一种被称为 6-氨基青霉烷酸的核心环。不同的青霉素在于其侧链基团的不同。



(a)



(b)

名称	取代基（R）
青霉素 G（天然）	
青霉素 V（天然）	
二甲氧苯青霉素（半合成）	
氨苄青霉素（半合成）	

(c)

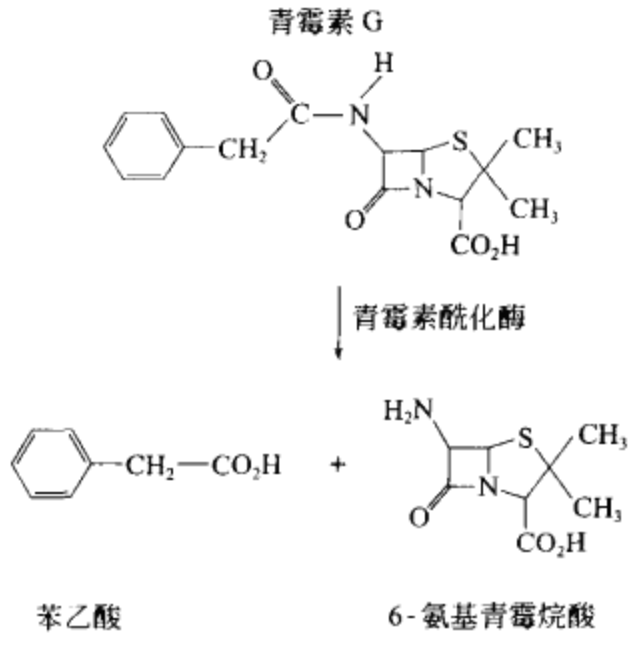
图 12.4

（a）6-氨基青霉烷酸的结构；（b）一般的青霉素结构；（c）两种天然青霉素和两种半合成青霉素的侧链基团

半合成青霉素可以通过酶法转移天然青霉素的侧链基团，把一种新的侧链接到合成的 6-氨基青霉烷酸的核心上来获得。青霉素 G 侧链的转移过程如图 12.5 所示，这个被青霉素酰化酶（青霉素酰胺酶或青霉素酰胺水解酶）催化的反应通常是可逆的。水解反应在碱性条件下进行。而生物合成中的酰化反应喜好中性偏酸性环境（pH4～7），通过这种途径青霉素酰化酶被用于将天然青霉素转化为半合成青霉素。每年全球 6-青霉素中间产物的产量估计为 7000t 左右。

大量的微生物都生产青霉素酰化酶，产青霉素酰基转移酶的各种微生物为：大肠杆菌（*Escherichia coli*）、假单胞菌（*Pseudomonas* spp.）、摩根支形杆菌（*Proteus rettgeri*，*P. morganii*）、短细菌（*Brevibacterium* spp.）、杆状菌（*Bacillus* spp.）、黄细菌（*Flavobacterium* spp.）、链霉菌（*Streptomyces* spp.）、气杆菌（*Aerobacter* spp.）、鲁雅菌（*Kluyvera* spp.）。其中大肠杆菌生产的酶最受重视。这个酶是一种异体二聚物，由一个位于青霉素侧链连接部位的20～23ku亚基和一个位于催化部位的60～69ku亚基组成。在此催化部位有一个丝氨酸残基对活性至关重要。虽然可以利用游离酶，但是其固定化形式被广泛应用于半合成青霉素的生产中，因为它比较经济，便于酶的多批次重复使用。

细菌对青霉素抗药性发生率的不断增加使半合成青霉素的继续生产显得至关重要。除此之外，许多半合成青霉素显示出新的医疗特性，一些半合成青霉素就比青霉素 G 更好地抑制细菌病菌。另一些则具有良好的酸稳定性，因此适用于治疗口腔疾病。



青霉素 G 是一种通过发酵可大量生产的天然青霉素，此反应是在碱性条件下朝指定方向连续进行的。由于一种反应产物是酸，因此 pH 必须不断地被调整从而保持碱性条件，转化完成时，pH 可能下降到 4.2～4.3，在此条件下，6-氨基青霉烷酸从溶液中沉淀下来。一些青霉素酰化酶制剂在温和的酸性条件下可催化可逆反应，这些酶被用于从 6-氨基青霉烷酸和相关的侧链基团合成半合成青霉素

图 12.5　青霉素酰化酶用于青霉素 G 的反应

重组 DNA 技术的出现已被用于抗生素的生产。此技术有助于弄清 β-内酰胺抗生素（如青霉素和头孢菌素）在分子水平上的生物合成途径。大量参与编码 β-内酰胺生物合成的特异酶的基因已经被克隆和鉴定，将这些基因引入生产菌株可使其合理地改良。这种基因操作可提高某些在工业上用于生产抗生素的真菌菌株的产量，对 β-内酰胺生物合成途径越来越多的了解，可以帮助研究者在分子水平上改变此途径，从而产出新型的抗生素分子。

12.3　酰化氨基酸水解酶和氨基酸的生产

与许多微生物不同，大多数动物不能合成用于蛋白质合成的所有天然的氨基酸。这些动物自身不能产生的必需氨基酸，必须从食物中获取。营养学家早已意识到为了确保动物的最佳生长，饮食中的蛋白质成分包含非常均衡的氨基酸组成，要包含必需的氨基酸。

在哺乳动物饮食中，赖氨酸和苏氨酸成分是必不可少的，对于猪和饮食以谷物为基础的禽类来说，它们也通常是初级和次级的限制性氨基酸，谷物来源的蛋白质的最大限度的利用，需要每吨饲料额外加入约 4kg 的赖氨酸晶体和约 2kg 的苏氨酸。另外一些也可能是限制性的必不可少的氨基酸（特别是如果动物饲料中大豆含量高时），它们包括含硫的氨基酸（半胱氨酸和甲硫氨酸）和色氨酸（图 12.6）。

转基因动物能够合成自身所必需的氨基酸，则可以解决以上必须补充含氨基酸均衡的饮食的问题。另外的一个办法就是构建能合成改变氨基酸组成的蛋白质的转基因植物。大豆中所含的主要蛋白质中甲硫氨酸和半胱氨酸的含量不高，已经鉴定出在一些大豆种子的蛋白质中富含甲硫氨酸，在转基因大豆中生产这种蛋白质能够补充对甲硫氨酸的需要。由于半胱氨酸可以由甲硫氨酸合成，因此半胱氨酸并非必需。然而这在自然界中是一个很漫长的过程。在此期间，营养学家必须确保动物的饲料中包含均衡的最佳氨基酸配比，因此，在饮食中补充特殊的氨基酸是必不可少的。

除了这些动物饲养业中大量需要的氨基酸之外，还有一些工业过程也需要大量的其他氨基酸。例如，谷氨酸被广泛用于食品工业，它的一种钠盐（谷氨酸钠）能使许多食品更加美

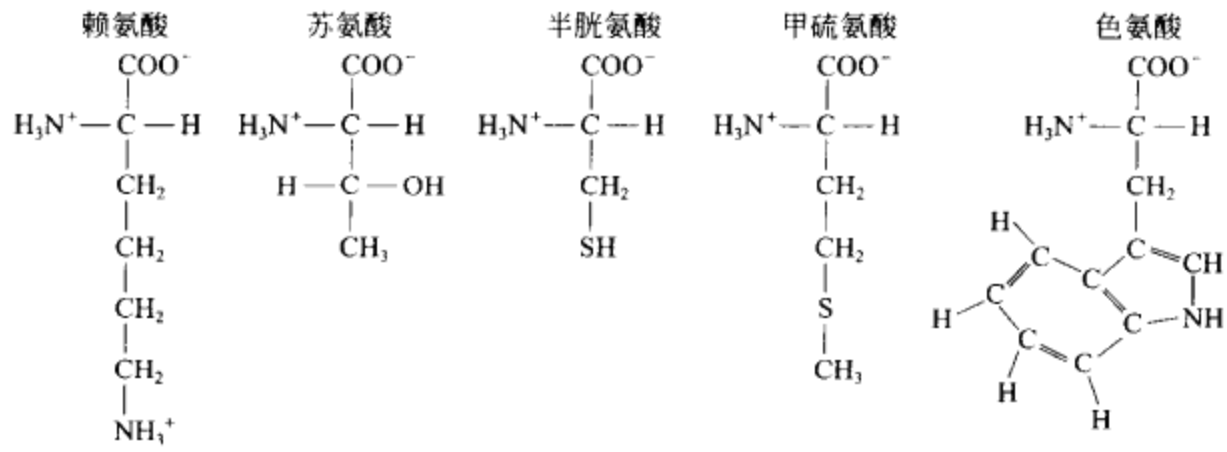


图 12.6　当单胃动物以谷类饲料为食时很可能形成限制性的氨基酸的结构

与这些动物相反，反刍动物能通过反刍微生物重新合成基本的氨基酸来获得较高水平的天然氨基酸

味，每年要生产成千上万吨的此类氨基酸。甜味剂（天冬氨酰苯丙氨酸甲酯）的发展（第 11 章）增大了工业上对它的两种氨基酸成分——苯丙氨酸和天冬氨酸的需求。医药、研究和其他一些特殊目的也需要不少其他种类的氨基酸。

化学法和酶法均可生产氨基酸，从经济的角度考虑，传统上一般选择化学法生产。然而，化学法会产生外消旋混合物，包括 L 型和 D 型两种氨基酸异构体，大多数高等生物只能利用 L 型氨基酸。因此从 D 型中将 L 型分离出来是化学法必须进行的工作，利用 L-氨酰转移酶可以很容易满足上述要求。

在化学法中，首选要将外消旋氨基酸混合物乙酰化，通常用乙酰氯或乙酸酐反应，然后此混合物要通过 L-酰化氨基酸水解酶的固定床，这种酶只去掉乙酰化的 L-氨基酸中的乙酰基，产生一种游离的 L-氨基酸和 *N*-乙酰基-D-氨基酸（图 12.7）。这就便于采用离子交换树脂或结晶的方法来分离它们。然后所得到的 *N*-乙酰基-D-氨基酸采用化学法（在碱性条件下加入乙酸酐）或酶法（用外消旋酶）来重新外消旋，然后消旋物同样流过固定化酰化氨基酸水解酶床。此流程在 1969 年首先被商业化。现在采用此工艺每年可生产超过 100t 的纯 L-氨基酸对映体。工业上所用的酰化氨基酸水解酶来源于 *A. oryzae*。这是一个分子质量为 73ku 的含有 Zn 离子的二聚体金属蛋白酶，Co 离子可以激活它。最适 pH 为 8.5，一直到接近 60℃的条件下仍然稳定。一种更加热稳定的酰化氨基酸水解酶已从 *Bacillus stearothermophilus* 中分离得到，它显示活性最佳的温度为 70℃，而且已经在各种重组体系中表达。尽管对 D 型异构体的需求量远比 L 型少，但还是可由 D-酰化氨基酸水解酶来制备旋光纯的氨基酸。D-酰化氨基酸水解酶已经从多种菌株中纯化得到，如 *Pseudomonas*，*Streptomonas* 和 *Streptomyces*。

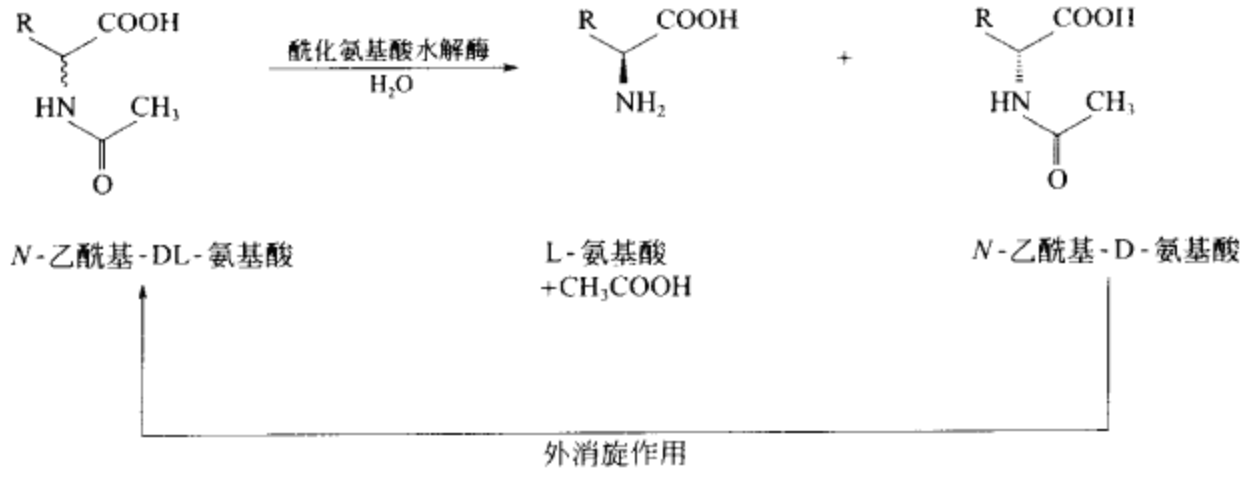
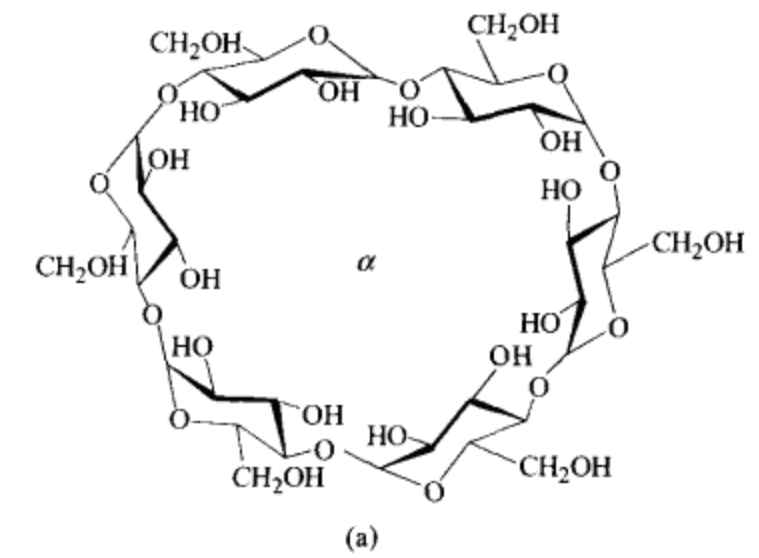


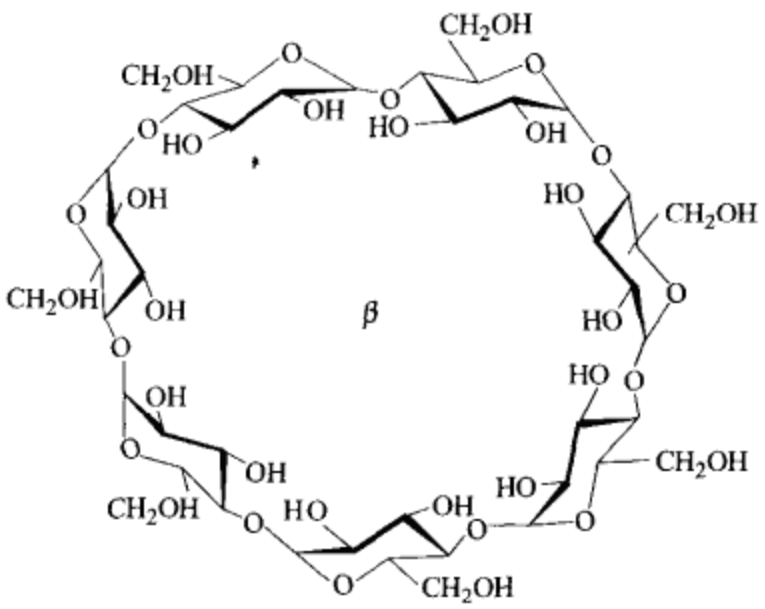
图 12.7　酰化氨基酸水解酶催化的反应

12.4 环糊精与环糊精糖基转移酶

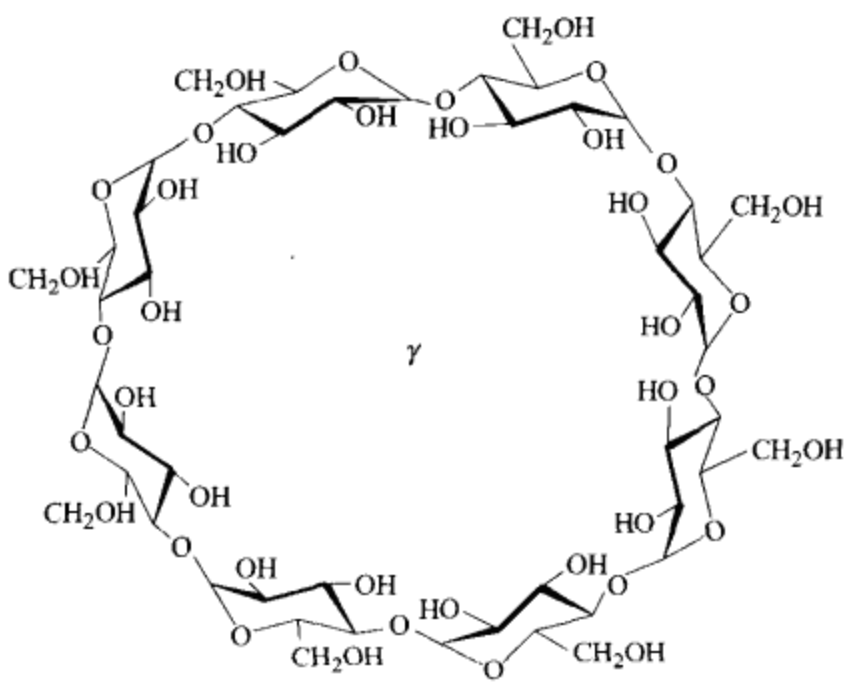
环糊精是一种环状的低聚糖聚合物，它可由酶法从淀粉中获得。已经确定了3种主要的环糊精类型（图12.8）α-环糊精、β-环糊精、γ-环糊精分别由6、7、8个葡萄糖分子组成。其中，每一个吡喃型葡萄糖结构单元均通过α-1→4糖苷键连接，这是线型淀粉分子的特征。



(a)



(b)



(c)

图12.8 α-环糊精、β-环糊精、γ-环糊精的结构

环糊精于100多年以前首次被研究，当时它出现在细菌的淀粉消化物中而引起人们的注意。然而在最近几年，这种物质已开始在工业上广泛生产，它们被应用在制药、食品、化妆品及其他相关工业中。

环糊精是圆环形分子，它的外面是亲水性的，而内穴是无极性的，当它溶解于水时，内穴被水分子占据，水的极性导致结构不稳定，加入比水分子极性小且分子尺寸合适的物质来代替水分子作为环糊精穴的客体分子，这种客体分子只通过非共价键连接存在于空穴中，这种整个客体分子-环糊精结构通称为包含络合物。

只有合适大小的分子才能形成稳定的包含络合物。α-环糊精的内穴显然是最小的，它的空穴往往只能容纳低分子量的分子或元素。例如氯，溴或碘。γ-环糊精分子中的空穴可以容纳类固醇或抗体等较大分子，一些出现在大分子中的侧链基团可以与环糊精空穴相互作用，通过这种方式可以形成一种复合体。

在这三种基本的环糊精中，β型是到目前为止在工业上最常用的。β-环糊精空穴的内部尺寸决定了它适用于许多方面。另一方面它的生产费用最低决定了它的经济可行性。然而，天然β-环糊精的可溶性较差，很容易得到14% α-环糊精溶液和23% γ-环糊精溶液。然而100mL水最多可

溶 1.8g β-环糊精，即 1.8%。如此差的溶解性限制了天然 β-环糊精在工业上的应用潜力。

修饰过的 β-环糊精的出现已经克服了以上提到的这种限制，将 β-环糊精的羟基基团置换成烃基、酯基或其他残基可以明显地提高其溶解性。而对其复合体的形成无影响，有些种类已经可以满足日益增长的工业化需要，如羟丙基 β-环糊精和羟乙基 β-环糊精。

环糊精与适当的物质相互作用能有效地形成分子微囊，就许多方面来说，这种微囊化十分有利。客体分子能免受许多化学因素或其他反应对其的破坏，这些被保护的分子不可能进行聚合或自身的催化作用。复合体的形成也能掩饰那些客体分子带有的不好的口味或气味，挥发性的化合物能通过与合适的环糊精络合有效地提高其稳定性，例如对氧气、光或热都敏感的挥发性香味浓缩物经常通过此方法得到稳定。

环糊精复合物的结晶过程可使它最初的液体形式转化成粉状客体分子，这在制药工业上意义重大。其复合物形式的另一个好处就是疏水性物质在水溶液中的溶解性，许多重要的药物在自然状态下都是疏水的，并能形成稳定的包含络合物，这些疏水的药物能在血液和肠胃道中安全地运转，然后在细胞表面释放，因为细胞膜的磷脂双分子层是疏水性的。因此环糊精在医药方面被用于提高不溶药物的生物药效，从经济、治疗及其他好处来看，可以做到低剂量给药。

环糊精也可用于稳定某些蛋白质，最小的多肽的大分子结构排斥完整的包含络合物的形成。然而，实际上所有的蛋白质都包含有氨基酸亚基，其中含有非极性或疏水的侧链，环糊精能与这些侧链自由地相互作用。通过这种方式，环糊精紧密地集合在蛋白质分子上，在高浓度条件下，环糊精会使蛋白质不稳定或变性。然而，大多数情况下，蛋白质与环糊精的相互作用有利于提高蛋白质的稳定性。环糊精已被证明具有减少由化学、物理因素（如热、冷冻干燥、氧化剂的存在或缺失）引起的酶活的损失。

在水溶液中，许多蛋白质会聚集，粉状的蛋白质制剂（如冻干制成的产品）有时也会在水溶液中重建时聚集成团。这种作用使任何制剂都不能用于静脉注射。为了使蛋白质-蛋白质之间相互作用减到最小或消除，生物制药产品的配方不总是产生满意的结果。许多生物制药产品，如生长激素、尿激酶和白细胞介素 2，仍然会明显地重组并聚集成团。在许多实例中，一种合适的环糊精制剂的内含物将消除这种不想出现的分子间的相互作用。

工业上对不断增长的环糊精糖基转移酶的需求反映了对环糊精越来越大的需求量。环糊精糖基转移酶（CGTase）适用于由淀粉分子为底物合成环糊精。环糊精也可用化学法合成，但酶法合成更加经济而且工艺更简便可行。

已确定有 α、β 和 γ 三种环糊精糖基转移酶的主要形式，从命名上可以看出 α-CGTase、β-CGTase、γ-CGTase 分别主要产生 α-环糊精、β-环糊精、γ-环糊精。然而，在所有的情况下，延长反应时间会得到三种环糊精的混合物，其中 β-环糊精是主要产物。

大多数环糊精糖基转移酶都来源于各种杆菌：

① 嗜热脂肪芽孢杆菌（*Bacillus stearothermophilus*）；

② 巨大芽孢杆菌（*B. megaterium*）；

③ 环状芽孢杆菌（*B. circulans*）；

④ 枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）；

⑤ 大肠杆菌（*E. coli*，重组）。

编码这些酶的基因密码已经被鉴定、测序并在许多重组体系中表达。许多宿主（例如 *E. coli* 和 *Bacillus subtilis*）已经生产出高水平的不同的 CGTase。生产 CGTase 的能力不断提高可减少环糊精的生产花费，这样可能会促进环糊精在不同工业中的应用。

近年来，每年环糊精的生产能力超过 100t，修饰后的 β-环糊精的产量也在不断快速增长，生产水平保证了下一步对环糊精糖基转移酶的大规模需求量，因此现在这些酶被分类为“大批量”的工业酶。

12.5 酶与动物营养

高等动物已经进化到具有复杂的消化系统，通过此系统它们从吸收的物质中获得营养。蛋白质、糖和脂肪等聚合物的降解通常是有效吸收营养成分的前提，大多数降解过程由特殊的消化酶介导。进化压力已经确保有效的消化系统得以发展。新一代密集型家畜产品的出现给此消化过程施加了压力，生物技术的介入能补充任何由新式生产方法引起的消化不均衡。

诸如小猪等幼小的动物是一个好例子。现代的生产使断奶从一个有序的渐进过程转化成一个突然的变化，饮食成分由以奶为基础突然改变成奶仅是复杂营养成分中的一部分。这种突变经常引起幼小动物消化紊乱，小猪经常表现出生理上缺少胃酸产生，因此，胃的 pH 会高于消化作用最佳的 pH。

另外，在年幼阶段的动物，其消化能力还没有发育完全。不好消化的食物会对它们造成营养的亚最佳吸收，没有完全消化的物质也会促进许多微生物在大肠中生长。这些都促使消化紊乱的开始和增加断奶后家畜腹泻发病率。

断奶有联系的消化困难可以通过喂养专门配制的消化的饲料和在饲料中加酸化剂（如柠檬酸）以便降低 pH 来解决。增加能水解更多复杂成分的外源酶也能促进消化。除纤维素和半纤维素酶之外，蛋白酶也被用于幼小动物的助消化剂。不足为奇的是，当动物饲料中含有更复杂的成分时，加入外源酶的效果是非常明显的。

12.5.1 除去不利于营养吸收的因素

各种酶制剂被用于把不利于营养吸收的因素从动物饲料中去除。在只含有家禽的饲料中加入 β-葡聚糖酶或许是一个最显著的例子。在以小麦为基础的家禽饲料中加入戊聚糖酶（木聚糖酶）是另外一个例子。以谷类为基础的动物饲料添加肌醇六磷酸酶的想法十分令人振奋，因为它不仅去除了主要的不利于营养吸收的因素，而且也大幅度降低了动物废弃物的污染问题（稍后讨论）。

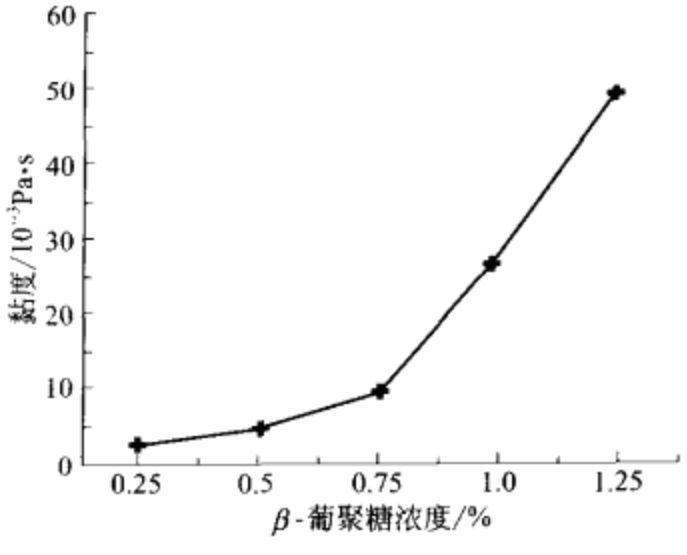


图 12.9 β-葡聚糖浓度的增加对水溶液黏度的影响

β-葡聚糖是一种非淀粉类多糖，主要存在于大麦中，由葡萄糖结构单元通过β1→3糖苷键或β1→4 糖苷键连接。存在于大麦中的 β-葡聚糖水平能显著改变并且被许多因素影响，例如土地类型、生长条件和收获时间。尽管一般水平为 2% ～ 3% 以下，但也有超过谷类含量的 10%。当被摄入时，存在于大麦中的 β-葡聚糖在内脏中是可溶的，动物缺乏能水解 β-葡聚糖分子的内生消化酶。

可溶性的 β-葡聚糖形成高黏性的溶液

(图 12.9)，因此它在饲料中的出现促进了高黏度消化物的形成。这对家禽的消化功能会造成负面影响，不能最大限度地利用营养物质，动物很难排泄。由于黏度特性，排泄物会黏在鸟类的羽毛上、草垫上和母鸡所孵的鸡蛋上。被摄入的β-葡聚糖所带来的多重负面影响一般会限制家禽饲料中的大麦加入量，这样做饲料成本可能更有优势。

一些微生物产生葡聚糖酶，这些酶能水解 β-葡聚糖。在家禽饲料中加入 β-葡聚糖酶有利于在饲料中加入大麦。在摄入过程中，来自于微生物的 β-葡聚糖酶降解存在的 β-葡聚糖，破坏其不利于营养吸收的性质，并得到提供能量所需的糖，这能明显地促进动物生长（表 12.3）。

表 12.3　在以大麦为基础的饲料中补充 β-葡聚糖酶对家禽的影响

饲　　料	每只家禽的饲料消耗量/(g/d)	每只家禽的增重量/(g/d)	消耗量与增重量之比
以小麦为基础的饲料	102.3	49.9	2.05
以大麦为基础的饲料	91.5	41.5	2.2
大麦和 β-葡聚糖酶	96.3	50.2	1.92

注：以小麦为基础的饲料作为对照。家禽的生长情况用消耗量与增重量之比来评价，这个比值越小，说明家禽越有效地利用了饲料中的物质。

小麦中包含有戊聚糖，它是一种不利于营养吸收的因素。戊聚糖是一种非淀粉类多糖，主要由木糖和棉子糖等糖类组成。动物中用于消化的酶类不能水解此类物质，和大麦中的 β-葡聚糖一样，戊聚糖在胃肠道中的溶解会致使消化物黏度增大。在以小麦为基础的饲料中加入戊聚糖酶（木聚糖酶）将破坏这种不利于营养吸收的因素。然而，戊聚糖的出现并没有像 β-葡聚糖那样引起麻烦。

12.5.2　肌醇六磷酸酶和植酸

大多数谷物中超过 75%的总磷量以植酸（又称“肌醇六磷酸”）形式存在，即植酸钙镁或肌醇六磷酸（图 12.10）。存在于植酸中的磷酸基团在非反刍动物中不能通过生物自身获得，这些动物缺乏从核心环结构中释放磷酸基团的酶活性。在反刍动物中，植酸被瘤胃中的微生物降解。像猪和家禽等单胃动物不具有获得磷的能力，这样可能导致磷的缺乏，这种现象可以通过在动物饲料中添加以磷酸二钙形式存在的无机磷而避免。植酸也是一种不利于营养吸收的因素，因为它可以使消化道中大量至关重要的矿物质凝固，如钙、锌、镁和锰，从而导致它们不能被吸收。

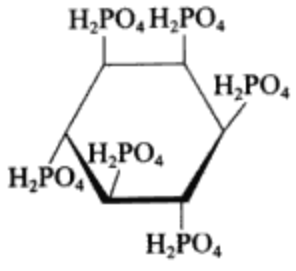


图 12.10　肌醇六磷酸（植酸或植酸钙镁）的结构

由于上文提到的原因，动物用于消化的物质缺乏能够降解植酸的酶活性。一些肌醇六磷酸酶（肌醇六磷酸水解酶）在植物和各种各样的生物体系中表达。肌醇六磷酸酶的活性已经在大量的植物特别是发芽的种子中被检测到，这些植物资源包括谷物（例如小麦、玉米、大麦和黑小麦）和豆类（例如海军豆、杯形豆和矮豆子）。小麦、裸麦和黑小麦是最富含植物肌醇六磷酸酶的资源。肌醇六磷酸酶也由各种细菌产生，包括大肠杆菌、芽孢杆菌、克雷伯菌（*Klebsiella*）和假单胞菌（*Pseudomonas*）。一般细菌产肌醇六磷酸酶的产量低，它是胞内产物并且在中性到碱性 pH 条件下保持最佳的酶活。目前已知唯一产胞外肌醇六磷酸酶的细菌是枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*），

B. subtilis（N-77 菌株）所产的胞外肌醇六磷酸酶已经通过凝胶过滤和离子交换色谱（DEAE）被纯化。有活力的酶是一个单体，分子质量为 36ku，p*I* 为 6.25，酶活的最适温度为 60℃。

与细菌不同，真菌产生一系列胞外和胞内肌醇六磷酸酶。曲霉菌属（*Aspergillus* species）是最多产的，特别是黑曲霉（*A. niger*），黄曲霉（*A. flavus*）和 *A. candidus*。根霉菌属（*Rhizopus*）和青霉属（*Penicillium*）的许多种也具有肌醇六磷酸酶活性。真菌所产的胞外肌醇六磷酸酶往往具有 35～100ku 的分子质量，p*I* 为 4～6.5，最适温度为 35～65℃，最适 pH 为 2.5～7。各种酵母，如酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）也产肌醇六磷酸酶。大多数微生物合成肌醇六磷酸酶的过程被微生物生长培养基中高水平的无机磷酸盐所抑制。

在饲料中加入微生物的肌醇六磷酸酶会促进消化道中的植酸降解，这种酶介导的降解会带来许多好处。肌醇六磷酸的降解消除了它不利于营养吸收的效果，因此促进了更多矿物质的吸收。从肌醇环中释放磷酸基团在动物中是可以通过生物方法达到的（表 12.4），这有利于在饲料中补充的无机磷大量被还原。

表 12.4　肌醇六磷酸酶对猪的磷平衡的作用

参　数	肌醇六磷酸酶饲料	对照饲料
磷摄入量(g/d)	8.3	7.3
磷吸收量(g/d)	5.4	3.5
吸收比例/%	65	48
维持比例/%	60	47

注：肌醇六磷酸酶饲料与对照饲料相似，只是补充了肌醇六磷酸酶。监控磷的摄入量和吸收量，含有肌醇六磷酸酶的饲料使磷的吸收和维持有所增长，所有的差别在统计学上是显性的［Pointillard 等(1987)，J. Nutr.，117，907］。

来自于动物产品的磷酸盐污染很长时间以来一直被关注，据估计，美国每年生产 1 亿吨动物饲料，其中包括 100 万吨磷。尽管动物不能消化植酸，但是出现在粪便中的许多微生物表现有较高水平的肌醇六磷酸酶活性，因此这种形式的磷会造成污染。

最早用于动物实验的肌醇六磷酸酶制剂来源于产肌醇六磷酸酶的真菌的多种菌株，最初筛选确定黑曲霉（*A. niger*）NRRL3135（通常记为 *A. ficuum*）为肌醇六磷酸酶产量最高的微生物菌株，因此肌醇六磷酸酶主要从它获得。*A. niger* NRRL3135 产生两种肌醇六磷酸酶：A 型和 B 型。肌醇六磷酸酶 A 是一个 85ku，含 448 个氨基酸的糖蛋白，包含 9 个糖基化位点，此酶在 pH 大约为 2～7 的范围内显示活性，两个明显的酶活最高峰在 pH2.5 和 pH5.5 处。另一方面，肌醇六磷酸酶 B 在 pH2～3 的较窄范围内显示活性。*A. niger* NRRL3135 也产一种胞外的磷酸酶，但它缺乏肌醇六磷酸酶活性（即它能脱去除植酸之外的磷酸化物质的磷酸基团）。

肌醇六磷酸酶产品经常由 *A. niger* 发酵得到，既可表面培养（采用小麦-麦麸为基础的培养基），又可深层发酵（采用玉米淀粉培养基）。天然产量低，外加酶合成过程中磷酸盐抑制，导致产品成本高，尽管传统的突变和筛选技术已经使突变株的产量有所提高，但现在添加在动物饲料中的大量肌醇六磷酸酶是由重组手段获得的。

“Natuphos”是来自于 *A. niger* NRRL3135 重组体的肌醇六磷酸酶的最初商业名称。该重组体是由 Gist Brocades 构建的，将此酶的密码子序列放在一个强启动子的下游（该葡萄糖糖化酶的强启动子来源于 *A. niger* 的一个工业菌株，它被 Gist Brocades 用于

生产葡萄糖糖化酶，生产水平为几克/升），此结构的多拷贝被插入 *A. niger*（自我克隆）。高水平的表达（并且除去磷酸盐抑制）使得大规模、经济的生产产品成为可能（图 12.11）。选择肌醇六磷酸酶是因为它满足在饲料添加剂的应用中实行的各种标准（后面讨论）。

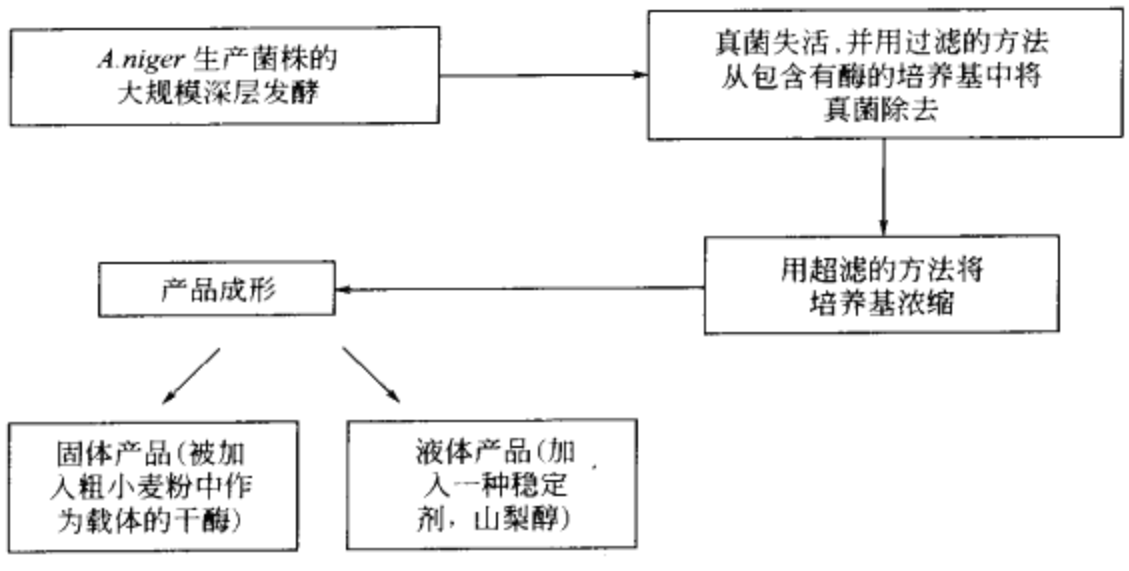


图 12.11　Gist Brocades 使用的生产重组肌醇六磷酸酶产品（Natuphos）的工艺流程

从 *A. niger* 中获得的肌醇六磷酸酶的基因最近已在转基因的烟草种子中表达，此重组酶在成熟的种子中表达 1%的可溶性蛋白。动物实验证实了将这些种子直接加入到动物饲料中会提高受体动物对植酸中磷的利用。

12.5.3　影响饲料酶功效和稳定性的因素

为了达到特殊的效果，向动物饲料中加入特殊的酶是现代农业生物技术中最有创新性的进步之一。使一种酶最大限度地适合于动物饲料添加剂的物化性质已完全被阐明，然而以下的特点可能是最重要的。

（1）酶的热稳定性　事实上，所有的动物饲料在它们被出售之前都要经过热处理，热处理是粒化过程的一部分。在此过程中，机械压榨后应用湿热处理。为了减少或消除饲料中的病原体，热处理对于颗粒饲料或非颗粒饲料都是必要的。一般来说，此过程需加热饲料到 75~90℃维持 2～3min。因此，加入到饲料中的酶必须具有热稳定性（可能通过喷射法在随后的热处理过程中将酶加到饲料中，然而喷射设备十分昂贵，并且经常使酶在饲料中添加得不均匀）。

（2）酶活与温度的关系曲线　酶在 37℃时应显示较强的活力，此温度决定了酶在被动物摄入时发挥功能。

（3）pH 与酶活的关系曲线　酶必须在消化道的一个或几个地方的 pH 下发挥作用。大多数来源于真菌的饲料酶在酸性 pH 下发挥最大活力，因此可能在胃和小肠（十二指肠）以上的部分发挥最大活力。另一方面，细菌酶（例如细菌淀粉酶和蛋白质酶）在中性或接近中性 pH 下显示活性，使小肠成为显示酶活的最可能的位点。

（4）在肠道中的稳定性　在饲料中添加的酶必须在消化道直到（并包含）预期它发挥作用的位置保持稳定性。在所有情况中，这意味着此酶必须在胃的酸性条件下稳定（胃的 pH 能低到 1.5），并且必须抗消化性的蛋白酶的降解，例如胃蛋白酶。

大多数添加到动物饲料中的酶在 50～60℃条件下显示最佳活性。当在缓冲液中被加热

到超过 70℃时，这种酶会很快失活。然而，当出现在饲料中时它们显示更强的热稳定性，可能是由于大量饲料成分的保护效应和体系中含水量低。大量的饲料组分也可能在胃的环境中发挥保护作用。

12.5.4 检测加入到饲料中的酶

由于调节的需要和考虑到粒化对酶活性的影响，有必要发展一个合适的方法来测定酶被加入食物后的活性和量。化验需要从饲料中提取出所补充的酶，通过与缓冲液搅拌混合，进而测定缓冲液中的酶活，许多技术上的障碍使这种饲料化验具有技术挑战性。通常酶的添加量很低（经常是每 1000kg 饲料添加 50g 酶），如此低的起始加入水平和随后的提取过程产生非常稀的酶溶液，这需要灵敏度较高的化验与较长的温育时间。

酶保温在其底物中经常是最方便被检测的，经过一段特定的时间就可对其产量定量测定（表 12.5）。自然状态下，所有饲料含有高水平的饲料酶所催化产生的还原产物，这些物质和酶一起被抽提到提取缓冲液中，这样会产生如此高的酶空白值以至于使化验结果不切实际。

表 12.5 添加到饲料中的常用酶及其常用于化验的天然底物

酶	底　物	被监测的反应产物
肌醇六磷酸酶	植酸	无机磷酸盐
β-葡聚糖	β-葡聚糖或地衣多糖①	还原糖
木聚糖酶	木聚糖	还原糖
纤维素酶	纤维素或改良纤维素（如羟甲基纤维素）	还原糖
蛋白酶	血红蛋白，酪蛋白，白蛋白	氨基酸/肽
淀粉酶	淀粉	检测淀粉的消失

① 地衣多糖是一种便宜的来源于 *Cetraria islandica* 的葡聚糖，像 β-葡聚糖一样，它由葡萄糖分子通过 β1→3 糖苷键和 β1→4 糖苷键连接而成。

采用其他各种化验方法来克服这种困难。其中最成功的是用显色底物或酶径向扩散的方法进行化验。显色底物是含有一个显色基团的合成或半合成物质。显色基团在适当的酶作用下被释放，释放的颜色可以用分光光度法定量测定。许多适合于化验从饲料中提取出的酶的显色底物是可以获得的（表 12.6）。

表 12.6 可以用于化验指定酶的合成的显色底物

酶	显色底物
β-葡聚糖酶	含氮的 β-葡聚糖
木聚糖酶	连接有 remazol 亮蓝的木聚糖(RBB)
纤维素酶	RBB-纤维素
蛋白酶	偶氮白蛋白
淀粉酶	连接有 ostazin 亮红的淀粉

通过酶径向扩散的方法测定酶活需要将酶的底物加入琼脂凝胶中，随后加包含酶的饲料抽提物至已在凝胶上打的孔内，然后此凝胶（通常被灌注在培养皿中）在适合的化验温度下培养一段时间。在此期间，酶穿过凝胶以径向向外扩散，降解与之相接触的底物分子，底物水解范围的直径与酶活成正比（图 12.12）。因此，这种化验方法是检测底物的降解而不是产品的生成。如果用一种显色底物，水解的范围会立刻很明显。如果用一种天然底物，随后

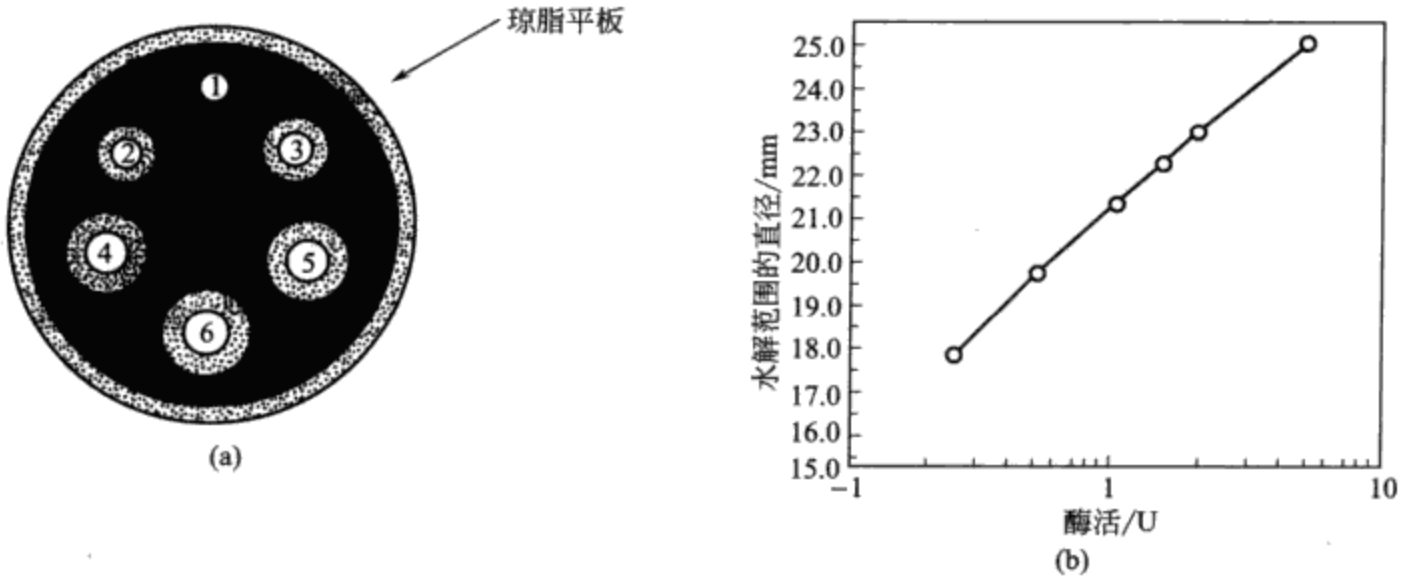


图 12.12　酶径向扩散法用于酶活定量测定的示意图

(a) 在含有底物的琼脂凝胶上打一系列小孔，酶被放入这些小格中，1 号格没有酶，2～6 号格中含有的酶活水平依次增加，测量底物被水解范围的直径；(b) 所得直径与酶活水平呈线性关系

必须在凝胶中加入一种只连接未降解底物的染料。例如刚果红只连接未降解的 β-葡聚糖或纤维素。

12.5.5　酶与动物营养以及未来发展方向

对于工业酶来说，动物饲料工业是发展最快的市场之一。在此领域中，近期的研究

表 12.7　饲料中存在的各种不利于营养吸收的因素以及它们对饲养的动物所带来的负面影响

不利于营养吸收的因素	在体内的主要作用
蛋白质	
胰岛素抑制剂	胰凝乳蛋白酶活性减弱 胰腺肥大，分泌胰腺酶过多
植物(种子)血凝素	内脏壁破损，免疫应答，内源蛋白大量损失
淀粉酶	干扰淀粉消化
抗原蛋白	干扰内脏壁的完整性，免疫应答
多酚	
丹宁酸	形成蛋白质-糖复合物，阻碍蛋白质和糖的消化
糖苷	
巢菜碱/共聚巢菜碱	溶血性贫血，干扰卵细胞的产生和受孕能力
皂角苷	红细胞溶解，影响肠道的渗透性
葡萄糖苷	
硫代葡萄糖酸盐	破坏碘的利用，影响甲状腺和肝脏，削弱味觉和生物体成长
生物碱	
喹嗪(羽扇豆碱)	神经中枢紊乱，削弱味觉
东莨菪碱和天山子胺(曼陀罗属生物碱)	
其他不利于营养吸收的因素	
肌醇六磷酸	与矿物质和蛋白质形成复合物，抑制矿物质的吸收
棉子酚	由于 Fe 络合产生贫血，减少卵细胞重量
芥子酸胆碱	在卵细胞中有腥臭味(感染)
肠胃气胀的因素	胃肠不适

注：经许可复制自 Recent Advances in Animal Nutrition, 1992, 7. Butterworth Heinemann, Oxford。

聚焦于不同的主题，微生物的筛选继续为酶的生产作贡献，所得到的新酶的物化性质比现用的酶更适合于做饲料添加剂。最符合要求的酶要有更强的热稳定性和在37℃时保持最佳活性。通过重组手段得到的酶产品也可能备受关注，因为生产酶的成本降低了，这对于价格敏感的动物饲料工业来说蕴含着巨大的经济利益。基因工程有利于给饲料酶提供新的特性（例如增加热稳定性）。此工业正在评价附加的酶活力，不仅限于在饲料中的应用。这些酶将达到特殊的目的，例如破坏特定的不利于营养吸收的因素（表12.7）。另外有研究将编码想要得到的酶活力的那段密码子序列整合到转基因植物中，随后将其喂动物（例如前面所讨论过的肌醇六磷酸酶活性在烟草植物中的表达）。另外一种方法是产生能合成新型消化酶的转基因动物。例如来源于 *Clostridium thermocellum* 的一种纤维素酶基因已经成功地在转基因老鼠的胰腺中表达。此酶被分泌进入小肠，在那儿它显示出抗内源蛋白酶水解失活的特性。这种研究表明，产生具有消化植物结构多糖能力的单胃动物是可行的。

12.6 氧化还原酶

氧化还原酶代表一大类酶。其中一些已经产生了工业价值，这些酶催化氧化还原反应，其活性位点含有一种辅助因子，例如烟酰胺腺嘌呤、核苷酸（NAD）、黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）或一种金属离子，它作为电子等价物的受体或供体，例如 NAD^+ 接受一个氢化物离子 H^-，其代表两种电子特价物。一些辅助因子被共价连接到氧化还原酶上，另外一些只以非共价连接方式与其相互作用，并能从酶的活性位点扩散出来。一种辅助因子的引入通常使氧化还原反应酶的工业利用变复杂。辅助因子长时间地与活性位点分离会造成酶失活（特别是如果酶被用于固定化的形式）。此外，通过一种合适的手段使辅助因子再生是可以达到的（见图12.13）。

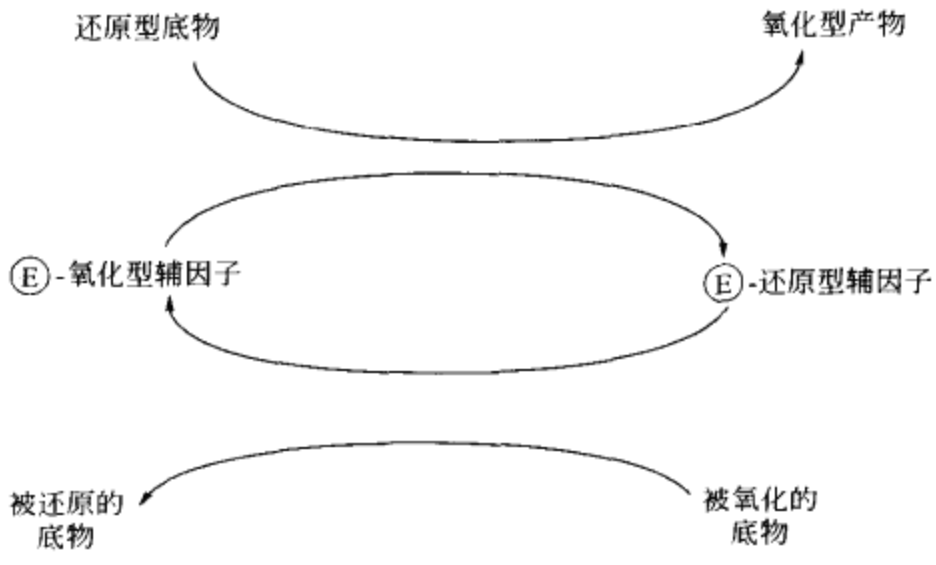


图12.13 氧化还原反应和酶的辅助因子的再生

一般的例子是在氧化还原酶的活性位点提供一个底物（还原型）的“停泊”点。此酶的氧化型辅因子从底物上接受还原型等同体，从而氧化它（即形成产物），在此过程中它自身被还原，就这个酶而言，为了促进另一种底物的催化转化，它的辅因子必须先被重新氧化，因此一个最终中电子受体（上图中所示的“被氧化的底物”）也必须存在

一些氧化还原酶显示出潜在的或现实的工业利用价值。脂肪氧化酶（lipoxygenases，LOX）与过氧化氢物裂解酶共同作用会显示出在调味品生物技术中潜在应用。脂肪氧化酶是一种包含 Fe 的非-血红素酶，它催化含有 1-顺式，4-顺式-戊二烯双键系统的不饱和脂肪酸的氧化反应（如亚油酸，图 12.14）。

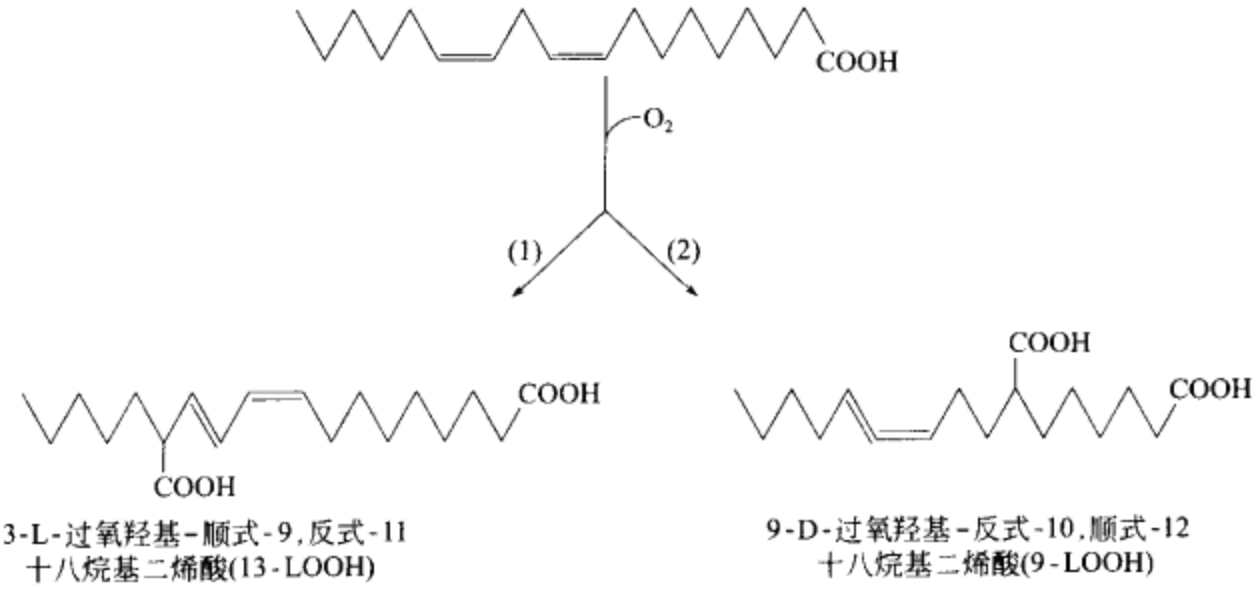


图 12.14　亚油酸的氧化反应

分别被大豆 I 型脂肪氧化酶（1）和西红柿脂肪氧化酶（2）所催化［文献提供：Godfrey & West (eds)（1986），Industrial Enzymology，2nd edn. Macmillan Press Ltd.，Basingstoke］

长期以来，真菌脂肪氧化酶，特别是来源于植物的脂肪氧化酶，是最受关注的。从大豆中得到的 LOX（异构酶 L-1）的三维结构已经被阐明，LOX 在植物中的出现既可产生想要的也可产生不想要的风味和气味。例如，它使豌豆产生差的口味，但却在使蘑菇和黄瓜产生特殊香味的众多因素中起核心作用。这种风味及气味依赖于底物（即脂肪酸）的存在、LOX 的特异性和其他酶的参与（图 12.15）。

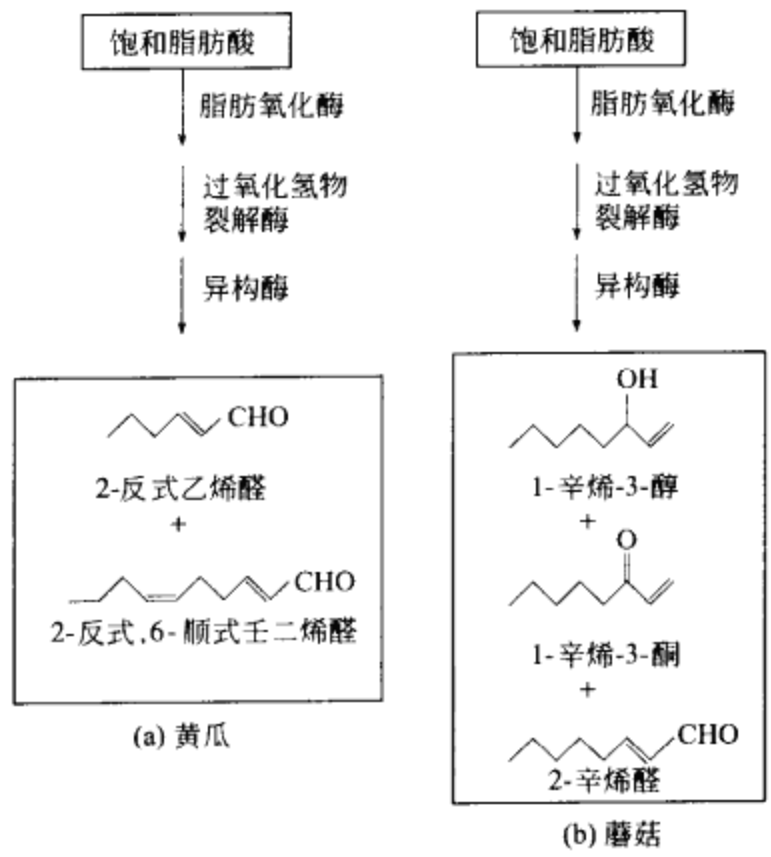


图 12.15　通过一种脂肪氧化酶介导的机制从饱和脂肪酸前体产生重要气味产品的过程

葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶是两种在工业上已经实际应用的氧化还原酶。它们用作各种诊断工具的成分（第 9 章）。此外，这些酶还互相结合共同用于食品工业，将存放有食物的密封容器中残留的氧气除去，这些氧气的存在会导致食物的腐败。氧气既促进好氧微生物的生长，又促使脂肪酸的氧化，因此引起食物腐臭。在此过程中氧气被消耗的机制如图 12.16 所示。

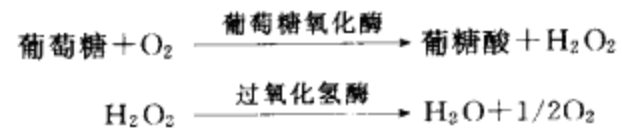


图 12.16　葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶组合介导的将残留的氧气从含有葡萄糖的食物中去除的示意图

进一步的细节请参考正文

12.7 分子生物学用酶

分子生物学主要是以纯理论性研究和工程应用为目的对核酸进行研究和操作，其基本技术依赖于特殊酶的运用。染色体 DNA 中特殊序列的分离和这些序列的扩增（DNA 克隆）需要用到两种酶，分别是限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶。以 mRNA 为模板制备 cDNA 的过程中逆转录酶起重要作用，而 DNA 聚合酶用于通过聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）催化特殊的 DNA 片段的扩增。

12.7.1 限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶

大多数微生物自身有许多机制可以保护其免受外来人侵的病毒和病原体引起的破坏。一种方法就是利用被称为限制性核酸内切酶的特殊的微生物酶，这种酶能切断外源的双链 DNA 从而阻止它的复制。宿主微生物的 DNA 可以被修饰，通常是 DNA 的特定序列的甲基化，这样可以保护宿主 DNA 免受其自身的限制性核酸内切酶破坏。

迄今为止已有 800 种限制性核酸内切酶被确定，它们均属于 3 种类型中的一种。Ⅰ型和Ⅲ型限制性内切酶的结构复杂，由许多亚基组成，并需要大量的辅助因子来维持其活性。它们的切割位置不在识别序列上。限制性核酸内切酶Ⅱ结构比较简单，通常由一个亚基组成，只需 Mg^{2+} 一种辅助因子，并且在此酶的识别和结合序列处切割 DNA，限制性核酸内切酶Ⅱ已经被广泛用作分子生物学的理论研究和应用。

限制性核酸内切酶的识别、结合和所切割的 DNA 碱基序列详见表 12.8。这些序列通常为围绕一个对称中心的反向重复序列，并且是 4 个、6 个或者 8 个碱基对的长度，这样的区域被称为回文结构。通常识别序列越大回文结构越少，得到的 DNA 片段越少，通过特殊的限制性核酸内切酶切割 DNA 可产生平齐末端和交错末端，后者通常称为黏性末端。

每种微生物表达一种或几种已经鉴定识别序列的限制性核酸内切酶，在 DNA 操作的研究和工业应用方面单独和组合使用均可。有一些限制性核酸内切酶的生物学特性不稳定，必须在－20℃以下进行运输和储藏。一些可大规模生产的限制性核酸内切酶见表 12.8。

限制性核酸内切酶也可用于限制性片段长度多肽性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）分析的第一步中切割染色体 DNA，用于检测和分析核苷酸序列的突变和修饰的另一种方法是切割片段长度多肽性（cleavase fragment length polymorphisms，CFLP），这需要用到一种专一性的切割单链 DNA 的内切酶。在这种情况下切割位点不由碱基序列决定，而是由单链 DNA 二级结构决定，详见信息框 12.1。

DNA 连接酶催化 DNA 中磷酸二酯键的形成，因此它们主要用于重组 DNA 技术的封口或在 DNA 克隆中将 DNA 靶片段连接到一种选定的载体中。可大规模生产的连接酶包括：T4 连接酶，分子质量为 55ku，包括 487 个氨基酸，来源于噬菌体 T4；大肠杆菌连接酶，分子质量为 73ku，包括 671 个氨基酸。最近一种热稳定的 DNA 连接酶（Taq DNA 连接酶）已经被大规模生产，这种连接酶来源于一种包含有从嗜热的水生栖热菌（*Thermus aquaticus*）中分离得到的连接酶基因的重组大肠杆菌菌株。

表 12.8　一些可大规模生产的限制性核酸内切酶以及它们的来源、DNA 识别序列和切割位点

限制性酶	来　源	DNA 识别序列和切割位点
Bcl Ⅰ	热溶芽孢杆菌(*Bacillus caldolyticus*)	5′-T↓GATCA-3′ 3′-ACTAG↑T-5′
Bgl Ⅱ	载有来自 *Bacillus globigii* 的 *Bg*/Ⅱ基因的重组大肠杆菌	5′-A↓GATCT-3′ 3′-TCTAG↑A-5′
Bsa AI	载有来自 *B. stearothermophilus A* 的 *Bsa AI* 基因的重组大肠杆菌	5′-PyAC↓GTPu-3′ 3′-PuTG↑CAPy-5′
Bsa JI	*B. stearothermophilus J*	5′-C↓CNNGG-3′ 3′-GGNNC↑C-5′
Bsi EI	*B. stearothermophilus*	5′-CGPuPy↓CG-3′ 3′-GC↑PyPuGC-5′
Eco RV	载有来自质粒 J62 plg 74 的 *Eco RV* 基因的重组大肠杆菌	5′-GAT↓ATC-3′ 3′-CTA↑TAG-5′
Mwo I	载有来自 *Methanobacterium wolfeii* 的 *Mwo I* 克隆基因的重组大肠杆菌	5′-GCNNNNN↓NNGC-3′ 3′-CGNN↑NNNNNCG-5′
TSP 509 I	*Thermus* sp.	5′-↓AATT-3′ 3′-TTAA↑-5′
Xba I	载有来自 *Xanthomonas badvii* 的 *Xba I* 基因的重组大肠杆菌	5′-T↓CTAGA-3′ 3′-AGATC↑T-5′
Xho I	载有来自 *X. holcicola* 的 *Xhol I* 基因的重组大肠杆菌	5′-C↓TCGAG-3′ 3′-GAGCT↑C-5′

注：G，鸟嘌呤；C，胞嘧啶；A，腺嘌呤；T，胸腺嘧啶 Pu，任意嘌呤；Py，任意嘧啶；N，任意嘌呤或嘧啶。箭头表示切割位点。

12.7.2　DNA 聚合酶

DNA 聚合酶催化 DNA 新链的合成，促进 DNA 复制和修复的进行，此酶在分子生物学中可用于通过 PCR 对特定的 DNA 片段进行扩增。在此过程中所用到的 DNA 聚合酶应具备热稳定性，因为 PCR 过程需要不断地循环重复多聚核苷酸的合成和热变性（95℃，用于分开 DNA 双链）。Taq DNA 聚合酶是第一个大规模生产的热稳定性的 DNA 聚合酶，此酶来源于水生栖热菌（*Thermus aquaticus*），在 75℃有活性，但在更高的温度下也十分稳定，它在 95℃条件下半衰期为 90min。随后，一大批热稳定的 DNA 聚合酶已经出现在市场上（见表 12.9），它们均来自于不同的超嗜热菌（第 10 章），但也已被用重组 DNA 技术生产，通常异种表达于重组大肠杆菌中，这些酶在 95℃时显示的半衰期均在小时这个等级上（如表 12.9 中的“Deep Vent” DNA 聚合酶在 95℃的半衰期为 23h，100℃的半衰期为 8h）。

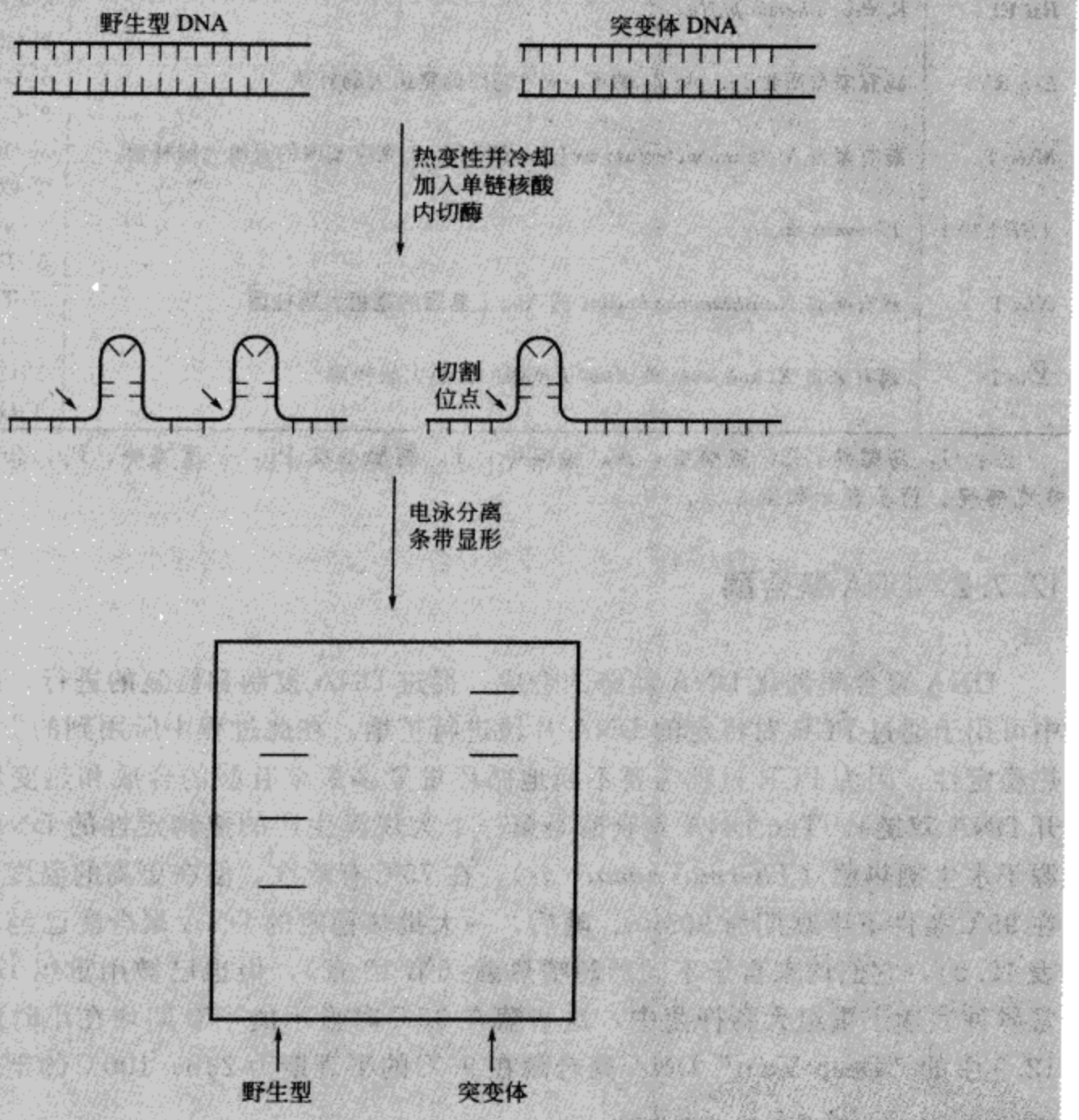
表 12.9　商业上现有的 DNA 聚合酶

商　品　名	来　源
Taq DNA 聚合酶	水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)
Tli DNA 聚合酶	*Thermococcus littoralis*
Pfu DNA 聚合酶	激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)
TfL DNA 聚合酶	黄栖热菌(*Thermus flavus*)
Tth DNA 聚合酶	嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)
Pwo DNA 聚合酶	沃氏火球菌(*Pyrococcus woesei*)
Vent DNA 聚合酶	*Thermococcus littoralis*
Deep Vent DNA 聚合酶	火球菌属(*Pyrococcus* sp.)
9°Nm DNA 聚合酶	热球菌属(*Thermococcus* sp.)

注：表中所列的来源均是天然菌株，然而大规模生产常用大肠杆菌重组菌株，所列出的绝大多数酶的分子质量均在 90～95ku 这个范围内。

信息框 12.1　切割片段长度多态性分析的基本原则

单链 DNA 局部发生自身回折，形成发夹形二级结构。剪切酶是一种大规模生产的热稳定的核酸内切酶的商业名称，它识别这种二级结构并立刻切割此结构相邻的单链聚核苷酸。突变、插入和缺失能影响这种二级结构。因此能改变此内切酶所介导的单链 DNA 消化谱型。此情况可以由凝胶分离 DNA 片段所检测，随后采用适当的方法将 DNA 带系显示出来，在所给的例子中，野生型 DNA 的突变只形成一种发夹环（与之相对的野生型 DNA 有 2 个发夹环），因此所产生的条带形式也不同。



12.8　进一步的阅读材料

图书

Malcata, F. (1996) *Engineering of/with Lipases*. Kluwer, Dordrecht.

Marquardt, R. (1997) *Enzymes in Poultry and Swine Nutrition*. International Development Research Cen-

tre, Canada.

Sivak, M. (1997) *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, London.

Woolley, P. (1994) *Lipases*. Cambridge University Press, Cambridge.

论文

脂肪酶

Muralidhar, R. *et al*. (2001) Lipases in raceimic resolutions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, (1), 3-8.

Pandey, A. *et al*. (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 119-131.

Planas, N. (2000) Bacterial 1, 3-1, 4-beta glucanases: structure, Function and protein engineering. *Biochem. Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1543**, (2), 361-382.

Saxena, R. *et al*. (1999) Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Curr. Sci.* **77** (1), 101-115.

Svendsen, A. (2000) Lipase protein engineering. *Biochem. Biophys. Acta-Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1543**, (2), 223-238.

Xu, B. (2000) Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **102** (4), 287-303.

动物营养中的酶

Bedford, M. (2000) Exogenous enzymes in animal nutrition-their current value and future benefits. *Anim. Feed Sci. Technol.* **86** (1-2), 1-13.

Bedford, M. &Schulze, H. (1998) Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutr. Res. Rev.* **11**, (1), 91-114.

Liu, B. *et al*. (1998) The induction and characterization of phytase and behyond. Enzyme and microbial technology. **22** (5), 415-424.

Mullaney, E. *et al*. (2000) Advances in phytase research. *Adv. Appl. Microbiol.* **47** 157-199.

Sebastian, S. *et al*. (1998) Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition; a review. *Worlds Poultry Sci. J.* **54** (1), 27-47.

Walsh, G. *et al*. (1993) Enzymes in the animal feed industry. *Trends Biotechnol.* **11** (10), 424-430.

Wodzinski, R. & Ullah, A. (1996) Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**, 263-302.

其他酶

Bruggink, A. *et al*. (1998) Penicillin acylase in the industrial production of beta lactam antibiotics. *Org. Proc. Res. Devel.* **2** (2), 128-133.

Hingorani, M. &O'Donnell, M. (2000) DNA polymerase structure and mechanisms of action. *Curr. Org. Chem.* **4** (9), 887-913.

Koob, M. (1992) Conferring new cleavage specifities on restriction endonucleases. *Methods Enzymol.* **216**, 321-329.

Kovall, R. & Matthews, B. (1999) Type Ⅱ restriction endonucleases; structural, functional and evolutionary relationships. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3** (5), 578-583.

May, S. (1999) Applications of oxidoreductases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10** (4), 370-375.

Shewale, J. *et al*. (1990) Penicillin acylases-applications and potentials. *Proc. Biochem.* **25** (3), 97-103.

Steitz, T. (1999) DNA polymerases; structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* **274** (25), 17395-17398.

(赵颖　译　　谭天伟 苏国富　校)

第13章

非催化的工业蛋白

13.1 引　言

前三章集中介绍工业级的酶，多种非催化蛋白的生产在生化领域也占着十分重要的位置（见表 13.1）。本章介绍的这些蛋白质主要来源于食品或者是应用于食品领域，食品中加入这些蛋白质或者是因为其具有明显的营养价值，更普遍的理由可能是因为这些蛋白质特殊的功能特性。

表 13.1　工业应用中的主要非催化蛋白

来　源	非催化蛋白	来　源	非催化蛋白
动　物	酪蛋白 乳清蛋白 明胶 卵清蛋白	植　物	大豆蛋白 小麦蛋白
		微生物	单细胞蛋白

注：虽然非催化蛋白主要作为人类的食物和动物饲料或其添加剂，但在非食品领域也有一些应用，例如用于制药或者化妆品制造。

13.2　蛋白质的功能特性

蛋白质的功能特性被广泛定义为用作食物添加剂的蛋白质的非营养性质。这些性质可能会对食物的外观、结构、质地、口感以及香味产生一定的影响。蛋白质在食品应用中的一些主要功能概括在表 13.2。这些特征大多数表现为与水结合的性质（如溶解性、可分散性、黏度和凝胶化）或者与表面相关的特性（如发泡性质和乳化性质）。

蛋白质的物化性质对其功能的影响是多种多样的，这些性质包括氨基酸的组成、序列、构造、分子大小、等电点及分子的柔韧性。虽然已经对添加到食品中的主要蛋白质的物化特性进行了详尽的研究，但是仍然不能预测蛋白质对于添加食品的确切影响，这可能是因为：

① 食品的加工过程可能导致蛋白质变性，从而改变其物化性质。

表 13.2　食品中添加的一些蛋白质所表现出来的功能性质

功能性质	蛋白质(举例)	食品(举例)
黏度	明胶	汤、肉汁和甜品
凝胶化(gelation)	乳蛋白和卵清蛋白	糖果蜜饯、肉类产品
内聚力(cohesion)	乳清蛋白和卵清蛋白	烘烤产品、意大利面、香肠
弹性	谷物产品	烘烤产品、肉类
脂肪或味道的结合	乳蛋白、卵清蛋白和谷物蛋白	糖果蜜饯、烘烤产品
乳化性质	乳蛋白和卵清蛋白	香肠、汤、蛋糕
发泡性质	乳蛋白和卵清蛋白	蛋糕、冰激凌、奶油布丁

② 食品蛋白质生产和提取方法的不同可能导致不同的产品组成，尤其是微小污染物的影响（比如乳蛋白中脂质的存在）。

③ 添加的蛋白质与食品中的其他成分相互影响，从而影响了观测到的功能效果。

13.2.1　黏度和增稠性

各种食品原料（如汤或肉汁）通常都含有黏性或增稠性的添加剂。当可溶性高分子聚合物（如多糖和蛋白质）溶于水时，即使浓度极低，也会得到黏稠的溶液。黏度的大小主要受聚合物的大小、形状、水合作用以及所形成的内部分子之间相互作用大小和范围等性质的影响。一般来说，黏度随分子量的增加而增加，任意卷曲或延展的聚合物的结构表现出的黏度要大于相同分子量的轻微折叠的聚合物。因此，这类延伸（与球体相反）结构的碳氢化合物、胶体和蛋白质（如明胶或部分变性的球状多肽）可以应用于食品领域作为增稠剂使用。

13.2.2　凝胶化、内聚力和弹性

大多数凝胶是由交联的聚合物组成，浸没于液体介质中，因而形成一个相互联系的三维网状结构。食用凝胶通常由交联的碳氢化合物或蛋白质或者有时是二者的混合物组成，浸没于水中。对于大多数食品蛋白质，凝胶形成的前提条件是部分聚合物的展开或变性，大多数通过加热变性来实现，也可以通过机械搅拌或改变蛋白质溶解的 pH 或离子强度来实现。之后，由于展开或延伸的蛋白质结构的相互作用，形成了延伸的三维网状结构。使凝胶结构稳定的分子间作用力范围和相对重要性主要取决于所使用的蛋白质的类型。共价键（二硫化物和 γ-谷氨酰基）和非共价作用力（氢键、静电作用和疏水作用）都对凝胶的稳定性有所作用（图 13.1）。

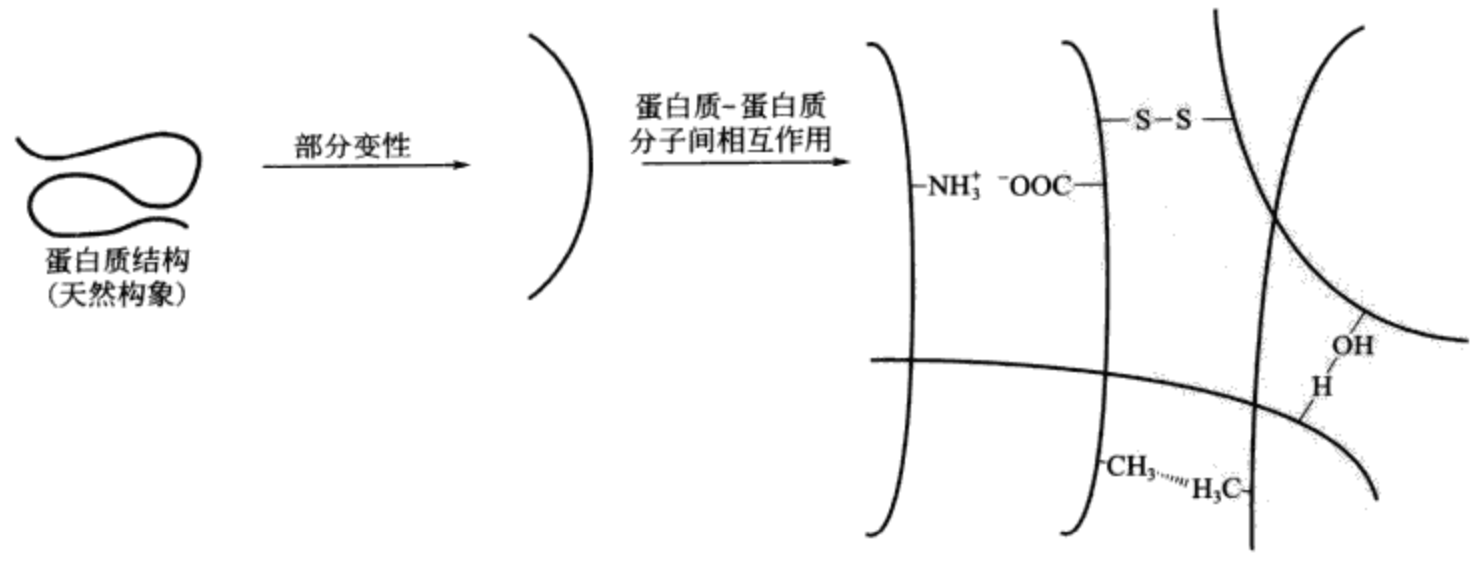


图 13.1　以蛋白质为基础的凝胶形成过程示意图

尽管图中没有表示出来，凝胶结构仍然受蛋白质分子和溶剂水分子之间氢键的影响

功能性质中的内聚力和弹性也受各个（有时是部分解折叠的）蛋白质分子内部相互作用的影响。内聚力通过巨大的非共价作用（氢键、离子作用和疏水作用）使蛋白质分子组成了一个松散的网状结构。这些力的非共价性质使得这种结合力较容易被破坏。弹性是靠缠绕在一起的蛋白质单体通过共价键和非共价键连接而形成的。这个性质将在随后介绍小麦蛋白的部分中进行详细的介绍。

13.2.3 脂类与香味的结合、乳化和发泡

食物中自然存在（或添加）的许多香味和香气组分都是分子量相对较小的疏水分子。这些组分与蛋白质表面的疏水基团或暴露在部分变性蛋白质的疏水末端相结合，从而保留或固定在食品中。具有极性的食品或者香精分子也可通过氢键或静电引力的作用结合在食品蛋白上。

大多数蛋白质都是两性分子（含有亲水和疏水两个区域），这个性质使它们更易于在食品工业中作为乳化剂或泡沫稳定剂来使用。食品大都是乳化的亲水和疏水成分的混合物，比如牛奶、黄油、冰激凌以及香肠等。还有很多食品实际上是发泡剂或者由泡沫制成（在这类体系中，微小的气泡可以在水中分散，例如生奶油、蛋奶酥、奶油冻、果汁软糖和蛋糕）。这两类产品的特征是非极性相（脂质或气体）分散在水相中。

这种油-水或空气-水的界面表现出较高的表面张力，如果不加入稳定剂（乳化剂），它们很难稳定存在。乳化剂（表面活性剂或发泡剂）的亲水和疏水区域沿着界面排列成一条直线，它的疏水基团在非极性相中相互接触，而亲水基团在极性相中相互接触，这样就减小了表面张力，并使乳状液变得稳定。

低分子量的表面活性剂（如甘油单酯和甘油二酯、山梨聚糖、硬脂酸盐和磷脂）和高分子量的表面活性剂（蛋白质和凝胶）作为乳化剂或发泡剂在食品工业中有着广泛的应用。表面活性剂分子的分子量越小，减少表面张力就越为有效。它们沿界面形成的阻碍要比蛋白质（大分子蛋白质）产生的硬脂酸阻碍物轻微得多（见图 13.2）。然而，蛋白质表面活性剂一

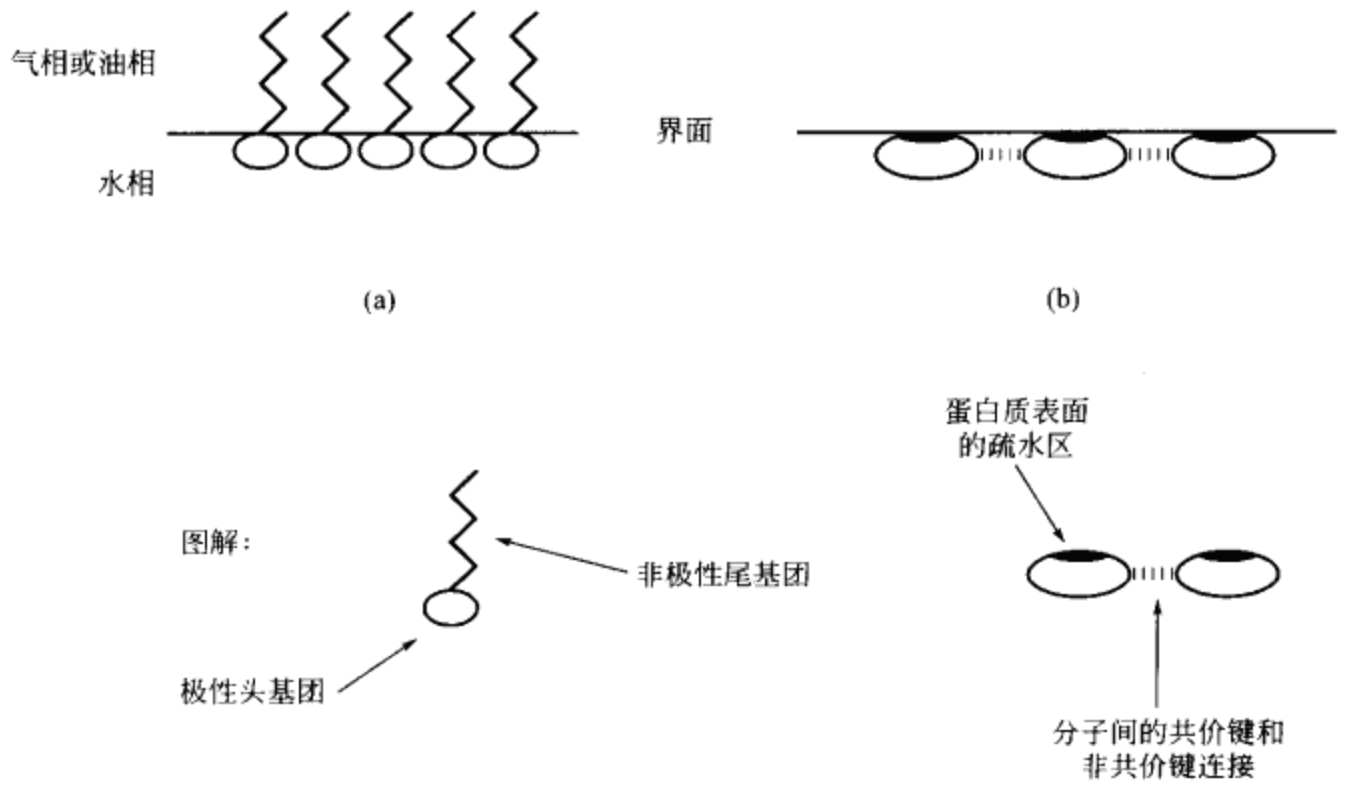


图 13.2 低分子量分子（a）与蛋白质表面活性剂（b）在气-水或油-水界面的相互作用

详见正文

般产生的气泡或得到的乳状液要更稳定一些。除了降低表面张力，表面活性剂在油、气滴表面形成的连续的薄膜通过分子间的二硫化物和非共价作用的连接使乳状液变得更加稳定。此外，聚集在水相-非极性相界面上也会促使大多数的蛋白质部分失活。

13.3　乳汁和乳蛋白

超过 4000 种雌性哺乳动物分泌乳汁，乳汁的基本组成成分见表 13.3。除了其主要的成分，乳汁中还含有几百种微量成分，包括维生素、矿物质和香味组分等。乳汁的某些成分的含量可以改变，随着物种不同，区别也十分明显。此外，同一物种不同动物个体由于品种、健康和营养情况等的不同，乳汁的成分也会受到影响。

表 13.3　人与几种重要的畜牧动物乳汁成分含量的平均值　　g/100ml

物　种	乳　糖	脂　肪	蛋 白 质	固体总量
人	7.0	3.8	1.0	12.0
牛	5.0	3.7	3.3	12.5
绵羊	4.8	7.5	4.5	19.0
山羊	4.0	4.5	3.0	12.3

乳糖是乳汁中含有的主要糖类。此外也存在少量的其他糖类（如葡萄糖和果糖）。大多数物种的乳汁中乳糖含量为 0.025～0.05g/ml，而海豹和海狮的乳汁中则没有乳糖。人类和猴子的乳汁中乳糖的含量要高于平均水平（一般为 0.07～0.1g/ml）。干燥的奶制品和乳清粉中，乳糖是主要的成分。

乳汁中脂肪含量也有明显的差异。畜牧动物乳汁中脂肪的含量为 0.03～0.07g/ml，海豚乳汁中其含量为 0.33g/ml，而格陵兰海豹乳汁中脂肪的含量则高达 0.5g/ml 以上。由于乳汁中脂肪的主要生物功能是为新生儿提供能量，因此生活在寒冷的或者海洋的环境中的动物乳汁中脂肪含量高就不奇怪了。大多数的乳蛋白（在后文中详细介绍）的生物功能则是为新生儿的蛋白质合成提供日常的氨基酸，此外还有其他的一些功能（如乳免疫球蛋白的保护作用）。

从物理化学的角度来看，乳汁是一种复杂的流体，包含有三相。其中乳糖和大多数的微量成分存在于真正的水相溶液中，蛋白质分散于该溶液中，有一些蛋白质（如乳清蛋白）可以完全地溶解，而其他蛋白质（如酪蛋白）则形成巨大的胶状聚合体，直径可达 0.5μm。脂质部分存在于被乳化的状态下，一般是 20μm 的小球体。虽然乳汁和乳蛋白在食品工业中有着极其广泛的应用（表 13.4），但目前特别关注的是一些主要的乳蛋白的生化性质、工业生产及应用的情况，这些蛋白质包括：

① 酪蛋白；
② α-乳白蛋白；
③ β-乳球蛋白；
④ 血清白蛋白；
⑤ 免疫球蛋白；
⑥ lactophorin；
⑦ 乳铁蛋白；

表 13.4 一些主要的乳制品的生产过程和用途

生产过程	主要产品	进一步生产的产品
离心分离	乳酪	黄油、乳脂肪、酥油乳酪：各种脂肪含量(HTST 灭菌和 UHT 杀毒)、早餐乳酪、搅打奶油、奶油干酪
	脱脂乳	奶粉、酪蛋白、干酪、蛋白质精料
浓缩热量蒸发或超滤		实罐或 UHT 灭菌牛奶、甜牛奶
浓缩和干燥		全脂奶粉、婴儿食品、日常产品
酶的凝结	干酪	1000 多个品种；进一步加工的产品，如加工干酪、干酪沙司
	酶凝干酪素	干酪类似物
	乳清	乳清粉、软化乳清粉末、乳清蛋白浓缩物、乳清蛋白分离物、乳清蛋白单体、乳清蛋白水解产品、营养医学品(neutraceuticals)
酸的凝结	干酪	新鲜的干酪和以干酪为基础的产品。功能应用，如早餐乳酪、肉类添加物；营养方面的应用
	酸性酪蛋白	
	乳清	乳清粉、软化乳清粉末、乳清蛋白质精料、乳清蛋白分离物、乳清蛋白单体、乳清蛋白水解产品
发酵		各种发酵奶制品，如酸乳酪、酪乳、酸奶、生物酸乳酪
冷冻		冰激凌(难以计数的类型和形式)
混杂		巧克力产品

注：HTST，高温短时间；UHT 超高温。摘自 Fox P & McSweeney P. (1997). Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic and Professional, London, p17。

⑧ 多种酶（如过氧化氢酶，溶菌酶）。

13.3.1 酪蛋白的生化性质

牛奶中含有四种不同类型的酪蛋白（四种相互关联又截然不同的基因产物），分别称为 α_{s1}-酪蛋白、α_{s2}-酪蛋白、β-酪蛋白和 κ-酪蛋白。牛奶中酪蛋白的总浓度大约为 25g/L，四种酪蛋白的比例为 4∶1∶4∶1。这四种酪蛋白相互作用形成胶束，颗粒直径为 50～250nm，此外还有含量不少的磷酸钙。

从生化性质角度看，酪蛋白性质如下：

① 分子质量大约为 20～25ku（α_{s1}-酪蛋白分子质量为 23.5ku，含 199 个氨基酸；α_{s2}-酪蛋白分子质量为 25.2ku，含 207 个氨基酸；β-酪蛋白分子质量为 24ku，含 209 个氨基酸；κ-酪蛋白分子质量为 19ku，含 169 个氨基酸）。

② 属于磷蛋白（几个丝氨酸残基的 R 基团被磷酸根基团所取代，并与 Ca^{2+} 紧密结合）。

③ 疏水性为主的蛋白质（氨基酸骨架中的疏水残基成簇出现），尤其是疏水的 β-酪蛋白（主要疏水残基为第 40～209 位残基）和 κ-酪蛋白（主要疏水基团为第 1～105 位残基，而剩余的分子高度亲水）。

④ 通常都含有大量的脯氨酸残基。

⑤ κ-酪蛋白分子表现出不同的糖基化水平（接近一半的 κ-酪蛋白分子保持非糖基化）。其他酪蛋白的类型缺乏甘油组分。

研究显示，单一的酪蛋白分子不呈刚性的三维结构（由脯氨酸含量高导致），但是它们互相之间形成了一个粗糙的球形胶团结构。胶团中酪蛋白分子的排列仍然是一个大家争论的话题。单个酪蛋白之间的相互作用可能是疏水作用、氢键和静电作用。磷

酸钙的存在很可能提供了使酪蛋白中的极性或带电物质稳定的相互作用。与 α_{s1}-酪蛋白和 β-酪蛋白不同，α_{s2}-酪蛋白和 κ-酪蛋白每个包含（两个）半胱氨酸残基，因此，能够在分子间形成二硫键，也可以使所有的胶团结构稳定。

已经证实，绝大多数的 κ-酪蛋白分子存在于胶团表面（也发现很少量的 s-酪蛋白存在于胶团表面，而高度疏水的 β-酪蛋白则被包埋在了胶团的中心位置）。κ-酪蛋白分子有一定的导向，使它糖基化的 C 末端由胶团向外伸出，而疏水的 N 末端朝向胶团内部，并与内部的酪蛋白相互作用（被认为是疏水作用）。因此，κ-酪蛋白的两性性质，使它们在正常的水相环境中保持稳定的胶团结构起着主要的作用（见图 13.3）。

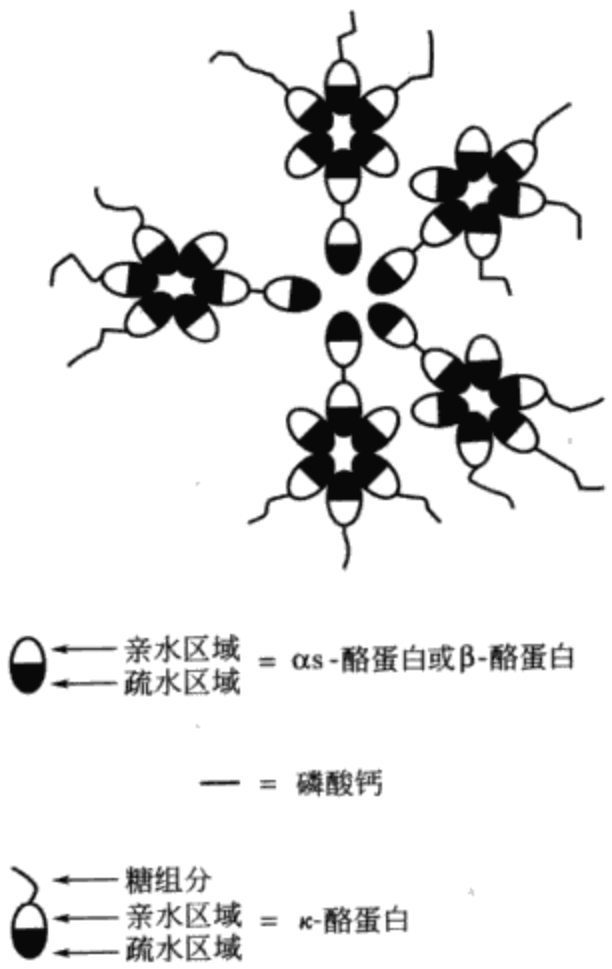


图 13.3　牛奶中酪蛋白胶团结构模式图
有人建议对模型进行修改，κ-酪蛋白分子中的亚胶团和外形延伸的糖组分的排列，可以解释电子显微镜下观察到的很多胶团的“发钩”外形

酪蛋白的胶团结构也可以用来解释为什么在奶中加入凝乳酶会使胶团结构不稳定，从而出现聚合物，并导致凝乳的形成（见第 11 章）。凝乳酶的选择性使 κ-酪蛋白 Phe^{105}-Met^{106} 处的肽键断开，这样 κ-酪蛋白的亲水成分被破坏，胶团不稳定，从而形成了修饰胶团的凝聚物（见图 13.4）。从生物学角度来看，酪蛋白似乎只有简单的营养功能，可以为新生儿提供氨基酸，此外，酪蛋白胶团也可以作为钙、磷酸以及少量的糖的来源（可从 κ-酪蛋白分子中的糖组分获得）。

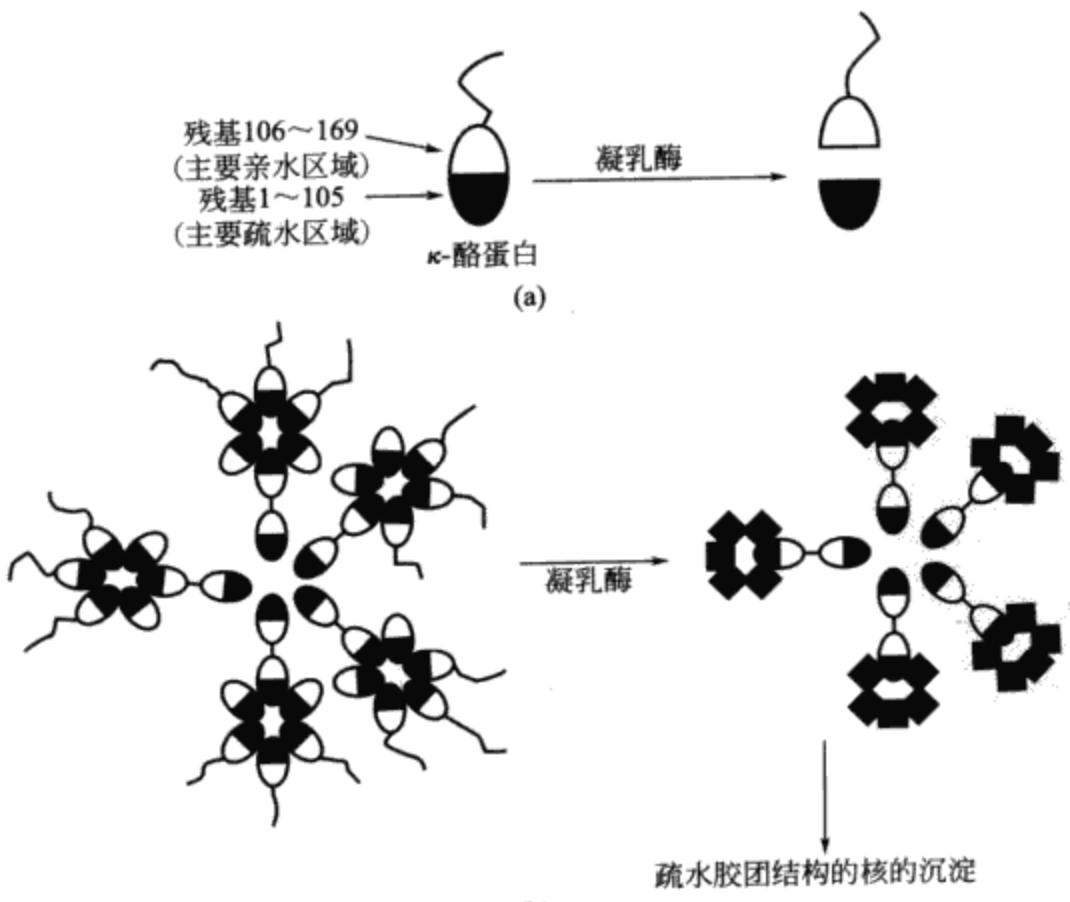


图 13.4　凝乳酶对单个 κ-酪蛋白分子的影响（a）以及酪蛋白胶团不稳定的效应导致形成聚集体（b）

13.3.2 酪蛋白的工业生产和应用

在实验室中，酪蛋白可以通过多种方法从全脂奶或脱脂奶中提取制备（见表 13.5），可是，从技术和经济等角度考虑，进行工业规模的分离、沉淀以及酶凝结（以凝乳酶为基础）等生产仍有很大的限制（见图 13.5）。酪蛋白的商业化已有近 80 年了，目前，年产量为 250000t 左右。生产的第一步离心除去全脂奶中的脂肪，得到脱脂奶。预先除去脂肪是为了避免后续干燥过程中由于污染物脂质的氧化，使得酪蛋白的干燥过程中产生异味。

表 13.5 实验室从牛奶中提取胶团酪蛋白的方法

方　法	详细介绍
离心	在 100000g 下离心 1h 使得胶团沉淀。预先加入 $CaCl_2$(0.2mol/L)可使胶团大量聚集，然后可用低速离心回收产品
等电沉淀	调 pH4.6，使牛奶酸化
盐析	加入硫酸铵(260g/L)沉淀酪蛋白(也含乳清蛋白)
乙醇沉淀	加入乙醇使溶液的醇浓度达到 40%，选择性沉淀酪蛋白
低温沉淀	将牛奶的温度降至－10℃，沉淀酪蛋白
超滤	全脂奶通过超滤可以浓缩/保留酪蛋白和乳清蛋白
凝乳酶处理	使聚集的酪蛋白胶团沉淀并易从牛奶中回收，κ-酪蛋白成分发生明显改变
色谱纯化	用离子交换和凝胶过滤层析法从其他乳蛋白的混合物中部分或完全分离酪蛋白

用等电沉淀法收回产品必须使奶酸化，生成“酸性酪蛋白”，酸化（调 pH4.6）可以通过直接加酸（通常加 HCl）或者通过较长时间的乳酸菌发酵来实现。后一个方法是加入乳酸菌在 22～25℃培养 14～16h（细菌将奶中的乳糖分解生成乳酸）。

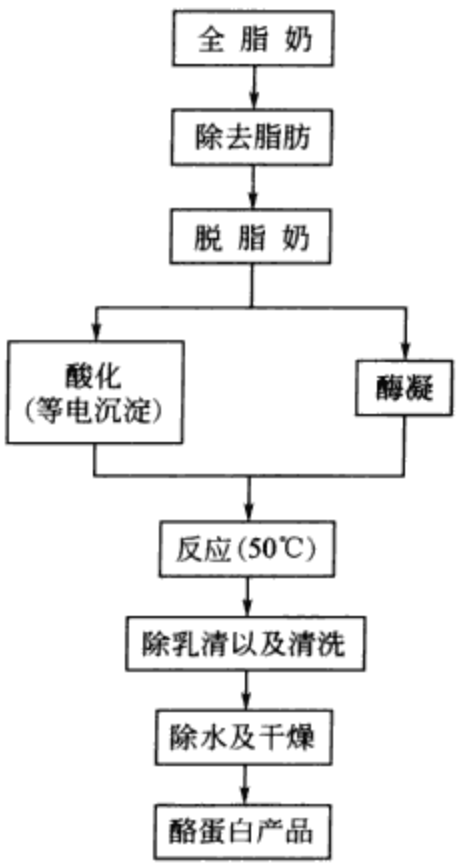


图 13.5 工业生产酪蛋白的主要方法示意图

当达到所需的 pH 时，蒸汽加热，使奶的温度达到 50℃，这样可以使酪蛋白最大量地沉淀下来（如凝乳的形成）。凝乳从剩余的液体（乳清）中通过过滤或低速离心的方法分离出来。干燥前，一般用热水洗涤以去除残存的乳清。干燥过程中首先用机械法挤压（有时也用离心的方法），然后产品被完全干燥（使产品的湿度低于 12%），这个过程先将酪蛋白放在振动的多孔不锈钢盘或传送装置上，然后通过孔隙传送热空气。在最后的包装之前，将产品磨成粉状，减小酪蛋白的颗粒并使之符合标准。

酶法生产酪蛋白与上述过程的不同之处仅在于酪蛋白是从脱脂奶中沉淀而得到的。该过程只加入凝乳酶，而不需要预先调节 pH 值（约 6.7）。加入酶的牛奶在 30℃左右放置一段时间，通常要有 1h 以上，这段时间实际上是凝结的过程（见图 13.4）。这就是所谓的酶凝干酪素生产，后面的工艺与酸酪蛋白的生产相似（图 13.5）。

酸性（酶凝）酪蛋白不易溶于水，工业上生产的可溶解的酪蛋白产品（酪蛋白酸盐）通常是先将酸性酪蛋白溶解于

碱中，之后喷雾干燥得到产品。一般用 NaOH 溶解酪蛋白、生成酪蛋白钠，有时也用 KOH、$Ca(OH)_2$或 NH_3，得到酪蛋白钾、酪蛋白钙和酪蛋白铵。

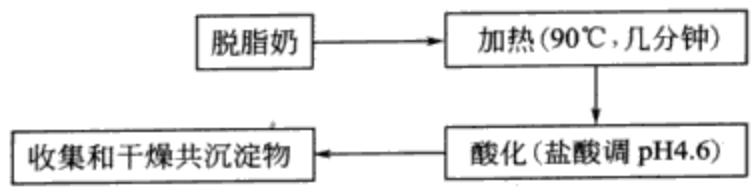


图 13.6　工业上共沉淀法生产概况
文中有详细介绍

采用酸法或酶法生产酪蛋白可以得到相对纯度较高的酪蛋白产品，另外一种生产乳蛋白的商业化方法称为共沉淀法，图 13.6 概括了共沉淀法。首先，将脱脂奶加热到 90℃使大多数非酪蛋白的乳蛋白变性。变性的乳清蛋白与酪蛋白形成了一种复合物，经过调 pH 至 4.6 酸化后，复合物从溶液中沉淀下来。这种酪蛋白-乳清蛋白共沉淀物占总乳蛋白的 90% 以上。

显然，商业化生产的酪蛋白是四种酪蛋白的混合物，尽管可以通过色谱法将其分离，但对于它们在工业上的应用而言是没有必要的。酪蛋白和酪蛋白酸盐在食品工业中有广泛的应用（见表 13.6）。乳化性质使它们的用途更加重要。酪蛋白酸盐或单体酪蛋白分子的乳化液十分稳定（完整的酪蛋白胶团乳状液不稳定），它们强烈的两性性质与构造的灵活性使它们沿着油-水界面延伸聚集。此外，它们的带电性质（主要由于它们实质上是磷蛋白）使得单个被乳化的小液滴像电荷一样相互排斥。通常酪蛋白也可以稳定的乳状液形式存在于高浓度的乙醇中，因此，可以作为牛奶的乳化剂使用。

与乳化性质相反，酪蛋白不适合于作为发泡剂使用。虽然酪蛋白溶液易发泡，但气液界面产生的气泡很快就会破掉，这又是酪蛋白生化性质的一个表现。尽管它们可以强烈地吸附到气液界面，但单个酪蛋白分子的亲水部分向内伸到液相中，不会进行相互作用。这种缺乏稳定的内部分子的相互作用导致产生一个脆弱的界面（见图 13.7）。所以酪蛋白不能单独作为发泡剂使用。

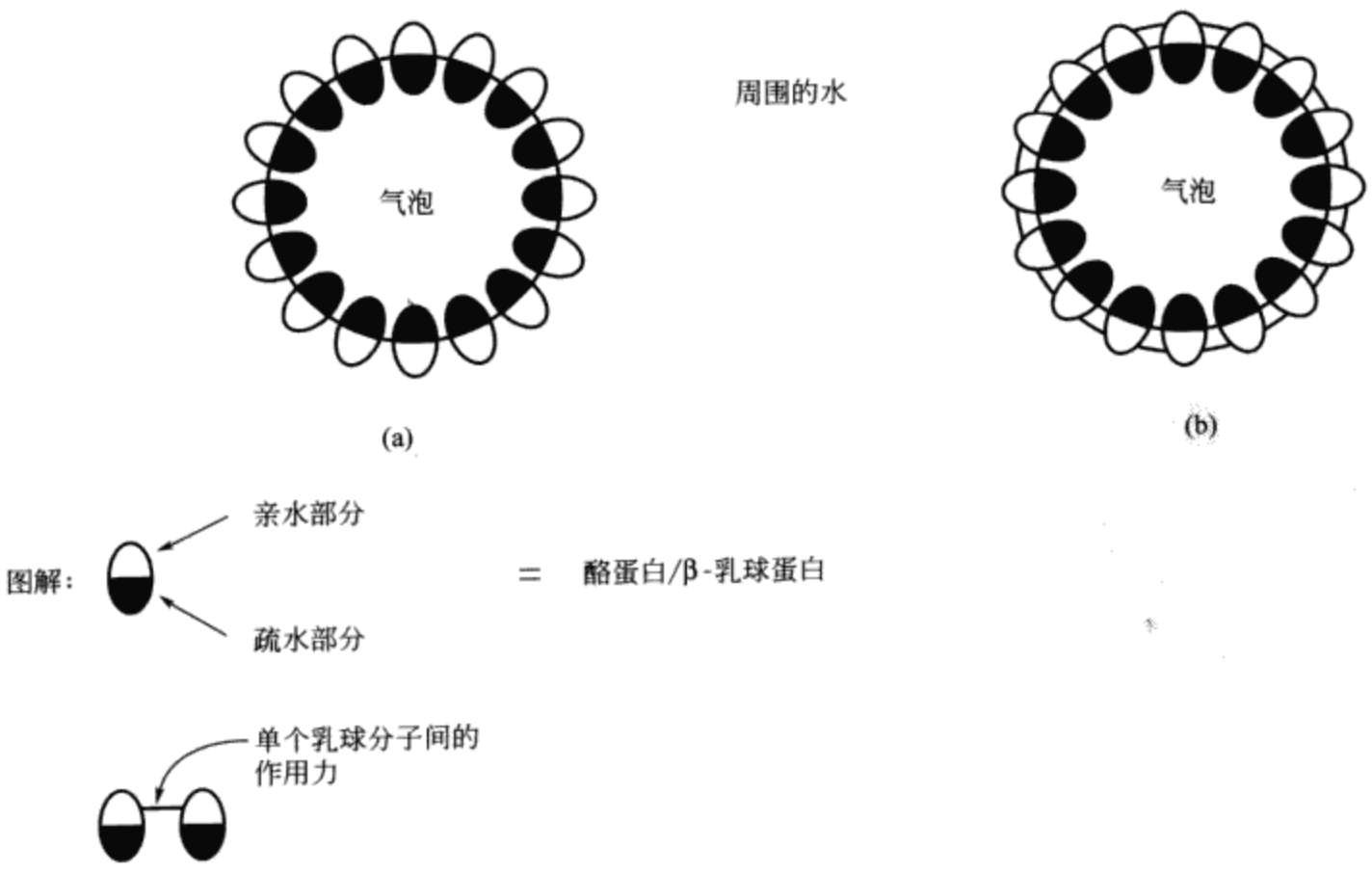


图 13.7　酪蛋白泡沫（a）与 β-乳球蛋白泡沫（b）的比较
β-乳球蛋白的泡沫由于分子间非共价键和二硫键的作用而变得稳定

表 13.6 从牛奶中提取的蛋白质在食品工业中的主要应用

焙烤食品
酪蛋白/酪蛋白酸盐/共沉淀物
应用：面包，油酥皮/饼干，早餐麦片，蛋糕粉，酥皮糕点，冷冻蛋糕和油酥皮，油酥皮表面涂的糖浆
作用：营养，口感，乳化剂，生面团稠度，松软度，体积和产量
乳清蛋白
应用：面包，蛋糕，小松饼，新月形面包
作用：营养，乳化剂，鸡蛋替代品
乳制品
酪蛋白/酪蛋白酸盐/共沉淀物
应用：人造奶酪（植物油、酪蛋白/酪蛋白酸盐，盐和水）
作用：脂肪与水结合，松软度，（油脂）熔性，易拉易切
应用：非乳制白油（coffee creamer）（植物油、糖类、酪蛋白钠、稳定剂和乳化剂）
作用：乳化剂，增白剂，稠度和松软度，减少羽状物形成，口感
应用：发酵牛奶产品，如酸乳酪
作用：提高凝胶的稳定性，减少脱水收缩
应用：牛奶饮料，人造牛奶，牛奶强化，奶昔
作用：营养，乳化剂，发泡性质
应用：多脂奶粉，使面点酥松的油脂，搅打奶油布丁和黄油酱
作用：乳化剂，提高松软度，口感
乳清蛋白
应用：酸乳酪，Quarg（一种不成熟食用的粗制脱脂酸奶干酪的通称），意大利乳清干酪
作用：产量，营养，稠度，凝乳内聚力
应用：奶油干酪，奶油干酪酱，乳酪切片，干酪馅饼和干酪酱
作用：乳化剂，凝胶性，口感
饮料
酪蛋白/酪蛋白酸盐/共沉淀物
应用：巧克力饮料，碳酸饮料及果汁饮料
作用：稳定剂，搅打和发泡性质
应用：利口酒，开胃酒
作用：乳化剂
应用：葡萄酒与啤酒工业
作用：香料去除，澄清，减少色素和涩味
乳清蛋白
应用：软饮料，果汁，橘粉或冷冻橘汁
作用：营养
应用：奶味饮料
作用：黏性，胶质的稳定性
甜食
酪蛋白/酪蛋白酸盐/共沉淀物
应用：冰激凌，冰镇甜食
作用：搅打性质，稠度和松软度
应用：奶油冻，即食布丁，搅打奶油布丁
作用：搅打性质，成膜剂，乳化剂，增加稠度和香味
乳清蛋白
应用：冰激凌，冰镇果汁棒，冰冻甜食外壳
作用：脱脂奶替代物，搅打性质，乳化剂，稠度/松软度
糖果
酪蛋白/酪蛋白酸盐/共沉淀物
应用：太妃糖，焦糖，软糖
作用：赋予弹性，耐咀嚼，与水结合，乳化剂

续表

糖果
应用：果汁软糖，牛轧糖
作用：发泡性，耐高温，改善味道和色泽
乳清蛋白
应用：充气糖果粉，酥皮，海绵蛋糕
作用：搅打性质，乳化剂
意大利食品
应用：通心粉，意大利面食和人造意大利面食
作用：营养，松软度，冻融稳定性，可微波加热
肉制品
酪蛋白/酪蛋白酸盐/共沉淀物
应用：肉馅
作用：乳化剂，与水结合性，改善稠度，减少肉蛋白形成凝胶和与水结合
乳清蛋白
应用：法兰克福香肠，午餐肉
作用：预乳化，凝胶
应用：注盐水强化所有肉制品
作用：凝胶，产量
方便食品
应用：肉汤粉，汤粉，调味料，奶油汤罐头和调味料罐头，脱水奶油汤和调味料，色拉味调料，微波食品，低脂方便食品
作用：增白剂，乳味香料，香味增强剂，乳化剂，稳定剂，黏度控制剂，冻融稳定性，蛋黄替代物，脂质替代物
松软产品
应用：酥皮点心，富含蛋白质的小吃，肉类添加物
作用：结构化，软化，营养
药物和医药产品
特殊的营养制品
生病期或康复期的病人
节食病人/人群
运动员
宇航员
婴儿食品
营养强化食品
母乳化婴儿食品
低乳糖婴儿食品
特定的矿物质含量平衡婴儿食品
酪蛋白水解酶：主要是用于医治腹泻、肠胃炎、半乳糖血症、吸收不良、苯丙酮酸尿症的婴儿
乳蛋白水解酶主要是用于血盐过低的婴儿食品
静脉注射剂
主要用于新陈代谢失调的病人、手术后肠胃消化不良的病人
特殊的食品制品
主要用于患有癌症、胰腺炎、贫血症的病人
特殊药品
β-酪蛋白吗啡主要用于睡眠或饥饿的调节或胰岛素分泌
糖肽磺酸盐主要用于胃溃疡的治疗
其他产品
牙膏
化妆品
治疗创伤的产品

注：本表摘自于 Fox P & McSweeney P (1997). Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic and Professional, London。

13.3.3 乳清蛋白的生化性质

牛奶中沉淀酪蛋白后的上清液称为乳清，等电沉淀得到酪蛋白后的上清液称为酸性乳清，而用凝乳酶调节凝结得到酪蛋白后得到的上清液称为酶凝乳清。所以，乳清是干酪生产的一个主要的副产物。表 13.7 为凝乳酶处理获得的乳清的主要成分。酸性乳清的组成与此类似，只是单个成分的确切浓度略有不同。大约 20%的牛奶蛋白是保存在乳清中的。同时，这些蛋白质又被称为“乳清蛋白”，“血清蛋白”或“非酪蛋白原”。主要的乳清蛋白已被归纳在表 13.8 中，包括 β-乳球蛋白，α-乳清蛋白，血清白蛋白和免疫球蛋白（主要是 IgG）。

表 13.7 凝乳酶处理得到的乳清的组成

物　质	含量/%	物　质	含量/%
乳糖	4.77	钾	0.13
蛋白质	0.82	钠	0.07
脂肪	0.07	磷	0.06
乳酸	0.15	水	93.0
钙	0.05		

表 13.8 主要（牛）的乳清蛋白的一些物理化学特征

项　目	β-乳球蛋白	α-乳白蛋白	血清白蛋白	免疫球蛋白 G
浓度/g·L^{-1}	2～4	0.5～1.5	0.4	0.5～1.0
分子质量/ku	18	14	66	约 150
氨基酸残基数	162	123	582	约 1360
半胱氨酸残基数	5	8	35	16
等电点(pI)	5.2	4.2～4.8	4.7～4.9	5.5～8.3
是否糖基化	没有	没有	没有	有

β-乳球蛋白大约占了整个乳清蛋白的 50%（大约是整个牛奶蛋白的 12%）。这个 18ku 的蛋白质根据基因不同被划分为 4 大类。它们之间的不同仅仅是因为一两个氨基酸被取代。β-乳球蛋白含有大量的半胱氨酸残基，通过 X 射线衍射表明其为一个紧密的球状结构，包含有 10%～15%α 螺旋和 45%β 螺旋结构。该蛋白是热不稳定性的，在温度高于 65℃的条件下就会发生变性。这表明这些高活性的巯基在蛋白质的食品功能和性质中起着重要的作用。β-乳球蛋白的四元结构对 pH 是依赖的。在 pH 低于 3.5 和高于 7.5 的条件下，它以单聚体形式存在，在 pH 为 3.5～5.5 时，它会形成一个八面体的结构，而在 pH 为 5.5～7.5 时，它就会以一个二聚物的形式存在。

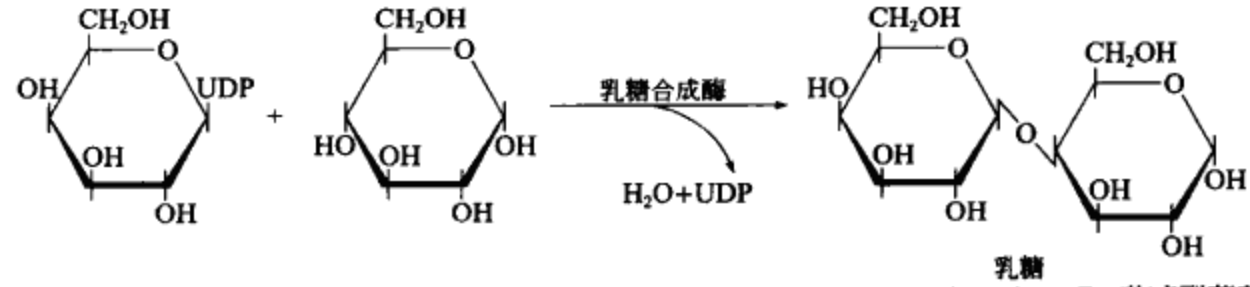
尽管农业上许多重要动物的乳汁中都存在 β-乳球蛋白，但是在一些哺乳动物的乳汁中却不含 β-乳球蛋白，包括人类。尽管人们已经知道在 β-乳球蛋白表面的疏水区域可以紧密地结合维生素 A，但是对于自然生理功能所起的作用仍存在着很大的争议。

α-乳清蛋白是在牛和许多其他哺乳动物的乳汁提取的乳清中含量第二多的蛋白质。对从大量哺乳动物乳汁中分离纯化得到的 α-乳清蛋白的研究发现，其结构高度保守。大多数种类的牛乳都只包括了一种 α-乳清蛋白（$\alpha\text{-}1_a$乳清蛋白），但是也有一些种类的牛乳包括了两个种 α-乳清蛋白（$\alpha\text{-}1_a$ 乳清蛋白和 $\alpha\text{-}1_b$ 乳清蛋白）。它们之间的区别仅仅是在于一个氨基酸。$\alpha\text{-}1_a$乳清蛋白在氨基酸序列的 10 号位置上是一个谷氨酸，而 $\alpha\text{-}1_b$ 乳清蛋白在这个位置上却是一个精氨酸。

α-乳清蛋白的色氨酸和含硫氨基酸（半胱氨酸和甲硫氨酸）的含量比较高。它的等电点大约为 4.8，在该 pH 区域里不易溶解。正如 β-乳球蛋白，α-乳清蛋白空间结构也是一个紧凑的球状结构，其中包含了 25%α 螺旋和 14%β 螺旋结构。它的三维结构与溶菌酶的结构很相似，这是这两种蛋白质含有大量相同氨基酸序列的一个反映。

α-乳清蛋白的热稳定性远远好于 β-乳球蛋白。虽然当温度超过 60℃时它会产生变性，但是温度降低时它又会复性。这种蛋白质的表面空隙中牢牢地键合着钙离子和其他二价阳离子，这个空隙中又容纳着三个天冬酰胺残基，并且去除与钙离子之间形成的键可以使得它热稳定性更好。

生物学上，α-乳清蛋白在乳糖的合成上起着直接和新奇的作用。在乳糖合成的最后一步，尿苷二磷酸盐（uridine diphosphate，UDP）-半乳糖和 D-葡萄糖的缩合反应就是通过乳糖合成酶催化进行的(图 13.8)。这种酶是杂二聚体，包括 A 和 B 两个亚基。亚基 A 催化半乳糖的转化，从 UDP 半乳糖转化成受体分子。在没有亚基 B 的条件下，大量的糖都能够充当受体。但是在 B 蛋白存在的条件下，反应就会变得具有特异性，仅仅只有葡萄糖能充当受体，同时这也确保了只有乳糖的合成。在牛奶中乳糖的浓度是与 α-乳白蛋白的浓度成比例的。动物的乳汁中缺乏了这种蛋白质也就没有乳糖（例如许多海生哺乳动物）。



β-D-UDP-半乳糖　　α-D-葡萄糖　　乳糖
[β-D-吡喃型半乳糖-(1→4)-α-D-吡喃型葡萄糖]

图 13.8　乳糖合成酶催化生物合成乳糖的最后一步

所有牛奶的乳糖都是由血液中的葡萄糖通过四步酶酶促途径合成的。其中一种酶是差向异构酶，使 UDP-葡萄糖转化为 UDP-半乳糖

研究发现牛奶中含有牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA），浓度通常在0.1g/L到 0.4g/L 之间。在血清中也发现了牛血清白蛋白，因此这种蛋白质很有可能是通过血管进入乳液中的。这个分子（66ku）比 β-乳球蛋白或 α-乳白蛋白大得多。它的氨基酸序列已经被确定，在三个特定的区域中仍呈现出一个球形。它的 17 个球内分子是通过二硫键连接起来的，就像半胱氨酸连着一个巯基（—SH）一样。在反应期间由于条件的改变会破坏二硫键使得蛋白质更加不稳定。BSA 溶液在加热到 40℃以上就会出现沉淀，这可能是由于蛋白质不能折叠导致分子间疏水作用的形成而引起的。BSA 在低 pH（约为 4）的条件下也会产生变性。这可能是由于氨基酸残基的正电荷相互排斥引起的（BSA 的 582 个氨基酸中含有 59 个赖氨酸、23 个精氨酸和 17 个组氨酸）。尽管人们知道 BSA 在血液中有着重要的运输作用，但是在乳汁中它的功能还不为人知。

在乳汁中发现的第四种主要的蛋白质类型是免疫球蛋白（Ig）。在牛奶中发现的免疫球蛋白的主要形式是 IgG，而在人乳中 IgA 为主要的类型。这些蛋白质的生物功能很明显具有免疫功能，为婴儿提供及时的免疫保护。在以分离的形式存在时，Ig 有高的伸展温度，但是在有其他蛋白质存在的时候它的热稳定性大大降低。这有可能是由于在 β-乳球蛋白和(或) BSA 分子间形成了二硫键。另有几种血清蛋白具有杀菌的作用。它们包括溶菌酶、乳过氧化物酶和乳铁蛋白。

13.3.4 乳清蛋白的工业化生产和应用

全世界的干酪生产每年产生超过 9000 万吨乳清副产物，其中包含了 63 万吨的乳清蛋白。这种蛋白质的初始浓度很低使得乳清蛋白产品相对比较昂贵，但是随着工艺水平的提高，尤其是超滤技术的不断发展，降低了生产成本。乳清蛋白的生产都必须有乳清的浓缩过程，然后一般是干燥过程。浓缩可以通过蒸发来实现，但是现在可以使用超滤的方法来代替(图 13.9)。在渗滤模式中（第 3 章），超滤的使用也可以使许多的小分子化合物从乳清蛋白中分离出来（如乳糖和矿物质）。

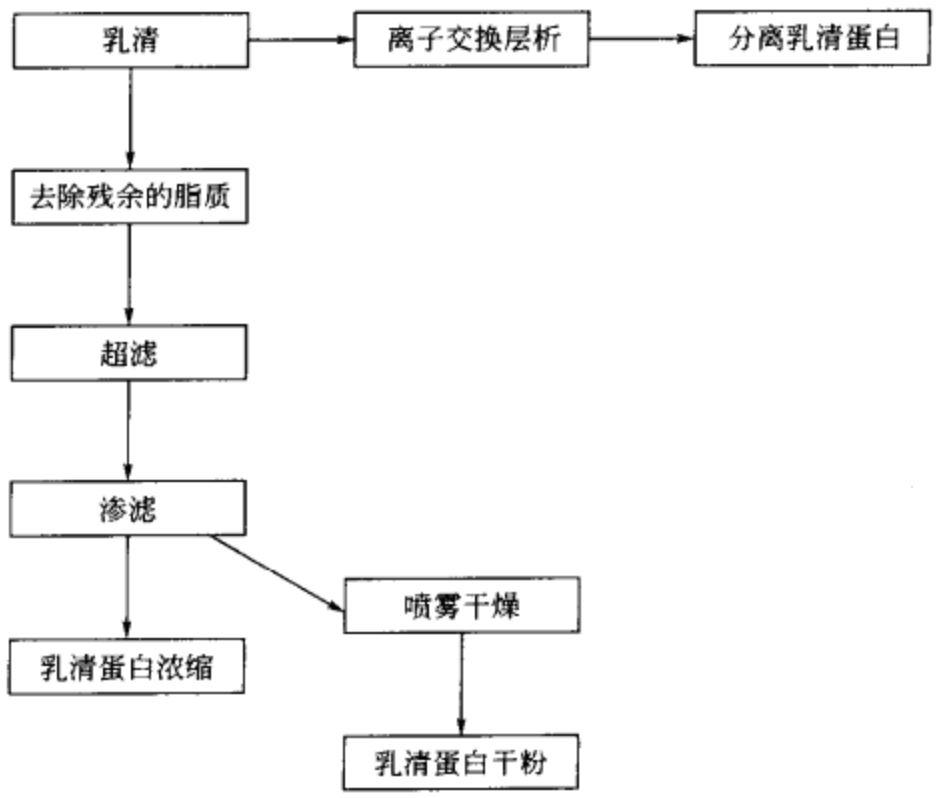


图 13.9 超滤法生产乳清蛋白的过程

详见正文

乳清处理的第一步不可避免地要将残余的脂质除去（目的是防止堵塞超滤膜和在最终的产品中含有脂质的气味）。通常是将 $CaCl_2$ 加入到乳清中，调节 pH 值到 7.3 并且加热到 50℃。在这样的条件下，就会形成钙合磷脂蛋白复合物，并且在溶液中沉淀下来。这些蛋白质（比如酪蛋白）就能够通过微滤或低速离心的方式除去。通过渗滤和超滤的联用就可以除去 10～50ku 的化合物，这样就达到了浓缩乳清蛋白产品的目的。浓缩液包含了 0.3～0.7g/ml 的蛋白质是商业上常见的产品形式。如果需要，浓缩液还可以进行彻底干燥，通常是经过喷雾干燥来完成。

乳清蛋白分离物通常包含大于 90%的蛋白质。工业上使用离子交换色谱。乳清最初的 pH 值应调到低于 4.6（如果用阳离子交换色谱）或高于 4.6（如果用阴离子交换色谱）。乳清的上样会使得蛋白质片段连接起来，接下来就是要洗去未结合的物质（如乳糖和矿物质）。然后再重新调节 pH 值使得乳清蛋白得到洗脱。如果需要的话，分离的乳清蛋白可以进行喷雾干燥。

乳清蛋白的产品根据人类营养和它的功能性质，已使用于动物饲料添加剂（乳清蛋白的浓度小于总蛋白含量的 55%）和食品工业（表 13.6）。从功能的角度来看，α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白是乳清蛋白的主要成分，它们具有表面活性功能（乳化和起泡），而且还具有水合和凝胶化作用。

13.4　动物蛋白和微生物蛋白

13.4.1　明胶

明胶是部分降解的和松散的胶原。胶原是结缔组织的主要成分，已经发现大量存在于腱、软骨、骨头、血管和皮肤中。胶原质的基本结构单元是原胶原，由单个胶原多肽的三螺旋构成，每个胶原多肽都包含大约 1000 个氨基酸。胶原是一个氨基酸组成特别的化合物，因为它的甘氨酸含量很高（23%）。胶原还含有大量的脯氨酸或修饰过的脯氨酸（3-羟基脯氨酸和 4-羟基脯氨酸）和其他修饰的氨基酸（5-羟基赖氨酸）。由于分子间的共价键和非共价键，胶原的三螺旋结构十分稳定。共价键主要是来自于上述所提到的修饰氨基酸。在整个胶原质纤维结构中每个原胶原蛋白分子都是通过分子间键结合在一起。

明胶的工业生产相对比较简单。原料（通常是皮肤和骨头）首先被除去非胶原化合物。然后再水浴加热，这能够促进胶原的提取，也可以使它转化为明胶。但是这种转化也会破坏胶原的纤维结构和原胶原蛋白分子三螺旋结构。一些胶原多肽的支架就会出现断裂。提取的明胶通常经过干燥后研磨成薄片或颗粒状产品。

明胶能够广泛应用于食品工业。由于它的氨基酸含量不平衡（表 13.9），所以它的营养价值不高。食品工业上主要是利用它的功能性质。明胶一个重要的功能性质就是能够形成凝胶结构。明胶容易溶解在热水中产生随机的胶原圈（ollagen-based coils）。当温度降到 35～40℃时，许多胶原多肽就会相互作用形成小片断的三螺旋结构。在三维点阵结构中，这些连接区有效地连接胶原多肽，因此形成凝胶。当加热到 40℃以上这些反应就会被抑制，又会出现一个熔融态的产品。没有外界破坏时，明胶溶液会经过许多个熔化和凝固的循环。明胶在食品工业中还可以用作为凝胶剂（如以明胶为基础的甜食，原文为 gelatin-based deserts，拼写有误——译者注）。这种蛋白质也具有很弱的两性性质，因此也可以作为乳化剂和起泡剂。正因为有这些作用所以明胶可以加入冰激凌和棉花糖（果汁软糖）中。

表 13.9　明胶氨基酸的组成

氨　基　酸	含量/%	氨　基　酸	含量/%
甘氨酸	23.0	羟基脯氨酸	12.7
丙氨酸	7.8	丝氨酸	0.36
缬氨酸	2.25	苏氨酸	1.7
亮氨酸	2.9	酪氨酸	0.45
异亮氨酸	1.26	天冬氨酸	6.0
半胱氨酸	0.09	谷氨酸	10.2
甲硫氨酸	0.9	精氨酸	7.3
苯丙氨酸	2.0	赖氨酸	3.7
脯氨酸	16.2	组氨酸	0.72

明胶也可以用于其他非食品领域，尤其是医药方面。在药品方面，常常是使用明胶制造胶囊，也可以在一些黏糊剂医学产品中作为增稠剂。它还可以用作栓剂和阴道栓生产的胶凝剂。因为它可以吸附本身重量 5～10 倍的水，因此在外科手术过程中可以用作海绵吸附血

液。可以广泛降解（例如长时间的加热）的明胶具有一定的黏性。这些降解的产物是生产动物胶水和黏合剂的基础。明胶主要的工业应用归纳在表 13.10。

表 13.10　由胶原衍生的明胶在主要食品与非食品类的应用

应用领域	具体用途
食品	凝胶试剂 稳定剂 稠化剂 乳化剂 起泡剂
制药/医药	凝胶胶囊 粘胶增稠剂 栓剂胶凝剂 外科海绵凝胶
其他用途	胶水制造 火柴头的包裹 纸张/纺织制造的上浆剂 照相软片 橡胶替代物的制造

13.4.2　卵清蛋白

在许多国家，鸡蛋是日常食品的一部分，尤其是饮食蛋白质的一个很好来源。产蛋的母鸡一年可以生 250 个鸡蛋。每个鸡蛋的质量都是不同的，它取决于母鸡的品种、年龄和营养状态，但是一般在 55～60g 之间。鸡蛋是由大约 10%的蛋壳、60%的卵白和 30%的卵黄组成的。许多加工的食品都把卵白和卵黄作为它的成分。这不仅是因为它们具有一定的营养价值，更主要的是它的功能特性。

食品应用中鸡蛋加工过程的第一步是机械破碎，然后过筛（以移除如蛋壳类物质）。为了抑制细菌生长这一步要在低温下进行。如果需要全卵，随后需要均一化。另一种方法是采取机械法分离卵清和卵黄，然后进行独立的均一化或混合。随后进行巴斯德杀菌。对于全卵或卵黄，这一步通常在 64.4℃持续 150s。卵黄的脂质部分能对热不稳定的蛋白质（主要是卵清蛋白）产生有效的保护作用。在低一些的温度下（约 57℃）对分离出来的卵清蛋白用巴斯德灭菌，虽然在这种产物中天然存在的溶菌酶有助于阻止细菌损坏。巴斯德灭菌完成后，降低处理温度，产物或者被冷冻、喷雾干燥、盐化，或者酸化以阻止细菌损坏。进一步加工以获得纯的卵清蛋白，通常不会进行。

卵清蛋白对于卵制品的整个功能特点有显著的贡献。卵清约含 86%的水，11%的蛋白质和少量的糖类、脂肪和矿物质。卵清中的主要蛋白质种类见表 13.11。在卵清中存在高浓度的卵清蛋白。它是含 385 个氨基酸，分子质量为 45ku 的磷糖蛋白。糖类组分通过包含 292 个天冬酰胺的 *N*-糖基链连接到多肽骨架上。卵清蛋白的三种不同组分能够通过等电聚焦分离。它们是蛋白质的非磷酸化、一磷酸化和二磷酸化三种形式。磷酸盐基团存在于丝氨酸 68 或丝氨酸 344 上。卵清蛋白也能在它的 N 末端乙酰化并包含四个半胱氨酸残基。

当加热时，卵清蛋白和其他一些鸡蛋的白蛋白会发生变性和凝结。类似凝胶结构是由分子间疏水作用形成的。凝胶的形成加强了食物结构和持水能力。同时，卵清蛋白有利于卵清

表 13.11　卵清中的主要蛋白质种类

蛋　白　质	卵清/%	分子质量/ku	等　电　点
卵清蛋白	52	45	4.6
卵铁传递蛋白(伴清蛋白)	13	78	6.6
卵类黏蛋白	11	28	4.0～4.3
溶菌酶	3.5	14	10.7
卵黏蛋白(α 和 β)	1.5	18(α) 400(β)	
免疫球蛋白(多种)	＜1.0	不同	不同

注：免疫球蛋白存在于卵白和卵黄中，详见正文。

的起泡性，虽然与凝胶和酪蛋白相比，它的起泡更温和。卵清蛋白溶液的搅动会引起蛋白质分子在气液界面的汇合，暴露通常埋藏在蛋白质中心的巯基基团，这会导致它们的部分变性。巯基基团容易氧化形成分子间二硫键，有利于泡沫的稳定。非共价键在卵清蛋白的泡沫稳定性中起着重要作用。

卵类黏蛋白和卵黏蛋白是蛋清中的其他蛋白质的代表。卵类黏蛋白是 28ku 的胰岛素抑制剂。它是一个相对热稳定的糖蛋白类，这个糖蛋白类的结构是三条通过链内二硫键连接的独立的主链。卵黏蛋白是一个硫代糖蛋白，它具有黏性或凝胶性质，在卵清的发泡性上有重要作用。它有 α 亚基和 β 亚基组成，分子质量分别是 18ku 和 400ku。这两种亚基是糖基化的，β 型分子量的 50%是糖类组分。

在食品工业中，大豆蛋白也是功能蛋白的重要部分。从大豆和其他豆类衍生而来的种子蛋白质属于球蛋白或白蛋白。球蛋白能占蛋白质的 90%以上并有存储功能。根据它们的沉降系数不同分成 75 球蛋白和 115 球蛋白（见表 13.12）。大豆球蛋白和 β-大豆球蛋白是大豆蛋白，具有形成凝胶的功能特性。大豆蛋白也有乳化作用，有利于汤、香肠和咖啡漂白剂中的油在水中的稳定。与鸡蛋蛋白相比，大豆蛋白用于改变食品功能性方面是不需要纯化的。

表 13.12　大豆中发现的以球蛋白为主的种子蛋白

类　　型	构　　成
75 球蛋白	β-大豆球蛋白，150～200ku 的糖蛋白；γ-大豆球蛋白，170ku 的糖蛋白；基本 75 球蛋白，168ku 的糖蛋白
11S 球蛋白	大豆球蛋白，300～380ku 的糖蛋白

13.4.3　单细胞蛋白

微生物是饮食蛋白质的有价值的源泉。实际上，这样的单细胞蛋白（single-cellprotein，SCP）产物自从上世纪之交以来就已引起大家的注意。微生物产品作为蛋白质来源有许多吸引人的地方。与传统的动物、植物蛋白来源相比，多种微生物代时较短。用于生产单细胞蛋白的发酵技术已较为完善。这个过程的完成不受季节、气候条件的限制，且可用易得、价廉的原材料。此外，大多数微生物的蛋白质含量是相当高的，有些多达 50%，也可用基因的干预提高产物蛋白的质量和数量。

用于生产单细胞蛋白的任何一种微生物必是第 2 章所列的一般公认为是安全的(GRAS)。这些可被人类直接消化的产品也可用于动物食品工业，如此以来，除细菌外，酵母也可用于生产单细胞蛋白。藻类和真菌将来也可以用于生产单细胞蛋白。随着世界人口的

稳定增长，未来微生物生产的蛋白质与其他营养物质的意义更显突出。

13.5 甜味和口味修饰蛋白

葡萄糖与果糖糖浆的产物及它们用作甜味剂的内容已在第 11 章提到过。然而甜味并不只是糖类物质所独有的味觉。多数特别甜的蛋白质（和肽）可通过品尝来鉴别。到目前为止发现的最甜的天然物质实际上是两种植物蛋白，奇甜蛋白（thaumatin）和应乐果甜蛋白（monellin，表 13.13）。到目前为止这些具有甜味特征的其他大多数蛋白质来源于某些非洲植物的果实或浆果。这些果实、浆果长久以来被当地的非洲人直接食用或用作食物甜味剂。例如，由于它们甜度高而用作低热量的甜味剂。与糖不同，它们不会损坏牙齿，可被安全地用作糖尿病人的甜味剂。

表 13.13 一些甜味和口味修饰蛋白及其来源

蛋 白 质	来 源	分子质量/ku	甜度(相当于同质量的蔗糖的倍数)
奇甜蛋白	*Thaumotococcus danielli* 的果实	22.2	3000
应乐果甜蛋白	*Dioscoreophyllum cumminsii* 的果实	11.1	3000
马槟榔甜蛋白	*Capparis masaikai* 的种子	14.0	400
Pentadin	*Pentadiplandra brazzenna* 的浆果	12.0	500
非洲奇果蛋白(Miraculin)	*Richadella dulcifica* 的浆果	28.0	无味
仙茅甜蛋白	*Curculigo latifolia* 的果实	27.8	550

奇甜蛋白是在非洲西部植物 *Thaumotococcus danielli* 的浆果中发现的蛋白质。虽然它的存在于 19 世纪 50 年代已有记载，但它被首次分离、定性，并商业化是在 20 世纪 70 年代。已知奇甜蛋白存在两种形式：奇甜蛋白Ⅰ和奇甜蛋白Ⅱ。前者的分子质量为 22209u，后者的分子质量为 22293u。二者均为 207 个氨基酸的多肽。由于 5 个残基不同在序列上存在差异，它们的三维结构为球形。β 结构有多个显著的分支。它们具有很强的热力学稳定性，甚至在沸腾 1h 后仍能保持甜味。8 个二硫键起主要的稳定作用，但在沸腾时蛋白质也可能部分打开。接着冷却后会重新折叠。奇甜蛋白通过与舌头上特定的味蕾受体结合，产生甜的感觉，它们比同质量的蔗糖甜 3000 倍，相当于等摩尔蔗糖的 10 万倍。

20 世纪 70 年代，Tate 和 Lyle 第一次以商品名“Talin”使奇甜蛋白获得商业化。除了在其本土非洲，产生奇甜蛋白的天然植物生长较差或果实很小，而 Talin 的生产是将本土收获的果实在冷冻后通过海运送到最终的生产地。浆果中 50%以上是蛋白质，压碎之后可以在水中被提取出来。可溶性提取物通过超滤得到浓缩，经过喷雾干燥、冷冻干燥后可产生最终纯化的产品。

奇甜蛋白基因已经被分离并在多种重组的微生物系统中得到表达，包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、链霉菌、酿酒酵母和 *Kluyveromyces lactis*。奇甜蛋白基因已经在转基因植物中得到表达，而且这些植物提取物已经表现出甜味。通过基因重组的方法生产的产品在克服来源可得性问题方面表现出明显的优势。这也允许生产出改变了氨基酸顺序的不同产品。这也可以证明有更甜的奇甜蛋白或具有改进了甜味特征的一类物质。就商业基础而言，重组的奇甜蛋白产品的主要技术障碍到目前为止来看是低的表达水平。

奇甜蛋白一般被公认为是安全的，在甜味浓度的下限，它可作为增味剂。已经发现它在动物饲料、人类食品、饮料、口香糖和空气清新剂的商业应用中作为甜味剂和增味剂。使用浓度

高时，它使食品表现出强烈的类似甘草的气味，这一点多少限制了它在食品行业广泛应用。

在 1972 年，应乐果甜蛋白第一次从西非的植物 *Dioscoreophyllum cummunisii* 中提纯出来。它是异二聚体，由 44 个氨基酸残基的 A 链和 50 个氨基酸残基的 B 链通过非共价键连接而成。全部分子质量是 11ku，蛋白质的等电点为 9.0～9.4。应乐果甜蛋白与奇甜蛋白表现出一些序列上的同源性，然而多克隆抗体阻止一个蛋白质与另一个蛋白质的交叉反应。应乐果甜蛋白表现出与奇甜蛋白相似的甜味。它没有奇甜蛋白稳定，在被消化后几秒不能觉察出甜味。然后，甜味感慢慢变浓又慢慢变淡，持续 1h。基于这样的原因，应乐果甜蛋白不可能像奇甜蛋白一样赢得商业青睐。

Pentadin 是另一种甜味蛋白。它第一次是 1989 年从非洲植物 *Pentadiplandra brazzenna* 的浆果中提取而得到。蛋白质的甜味谱型多少类似于应乐果甜蛋白。

仙茅甜蛋白是异二聚体蛋白质，分子质量大约 28ku。它是从生长在马来西亚西部的香草 *Curculigo latifolia* 的果实中得到的。该蛋白质的甜味比蔗糖高 500 倍以上，但是它也有修饰甜味的特性。

最后，非洲奇果蛋白最初是从西非的灌木 *Richadella dulcufica* 的浆果中分离出来的，有 191 个氨基酸，28ku（糖蛋白）。这种蛋白质自身是无味的，它能把原味物质改变成甜味物质。例如，先嚼含非洲奇果蛋白的浆果后再吃柠檬，尝起来有橘子味。从应用前景来看，这种蛋白质的缺点是在味觉受体上结合很长时间，甜味可持续 2h 以上。

13.6　进一步的阅读材料

图书

Anonymous (1985) *Whey*. National Dairy Council.

Damodaran, S. (1997) *Food Proteins and Lipids*. Plenum Publishing, New York.

Fox, P. & McSweeney, P. (1997) *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Blackie Academic and Professional, Glasgow.

Gillies, M. (1974) *Whey Processing and Utilization*. Noyes Data Corporation, USA.

Hittiarachchy, N. (1994) *Protein Functionality in Food Systems*. Marcel Dekker, New York.

Pinder, A. (1980) *Milk and Whey Powders*. Society of Dairy Technology.

Whitaker, J. (1999) *Functional Properties of Proteins and Lipids*. American Chemical Society.

Zayas, J. (1997) *Functionality of Proteins in Food*. Springer-Verlag, Godalming.

Articles

Proteins; functional properties

Dickinson, E. (1997) Properties of emulsions stabilized with milk proteins: overview of some recent developments. *J. Dairy Sci* **80** (10), 2607-2619.

Dickinson, E. (2001) Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids Surf. B*-Biointerf. **20** (3), 197-210

Fligner, K. & Mangino, M. (1991) Relationship of composition to protein functionality. ACS Symposium Series, **454**, 1-2.

Gosal, W. & Ross-Murphy, S. (2000) Globular protein gelation. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **5**

(3-4), 188-194.

Hansen, A. & Booker, D. (1996) Flavor interaction with casein and whey proteins. *ACS Symposium Series* **633**, 75-89.

Lucey, J. & Singh, H. (1997) Formation and physical properties of acid milk gels; a review. *Food Res. Int.* **30** (7), 529-542.

Morr, C. & Ha, E. (1993) Whey protein concentrates and isolates-processing and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* **33** (6), 431-476.

Nishinari, K. *et al.* (2000) Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **5** (3-4), 195-201.

Taylor, S. & Lehrer, S. (1996) Principles and characteristics of food allergens. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**, S91-S118.

Wilde, P. (2000) Interfaces; their role in foam and emulsion behaviour. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **5** (3-4), 176-181.

乳蛋白

Bounous, G. *et al.* (1991) Whey proteins in cancer prevention. *Cancer Lett.* **57** (2), 91-94.

Clare, D. & Swaisgood, H. (2000) Bioactive milk peptides; a prospectus. *J. Dairy Sci.* **83** (6), 1187-1195.

Creamer, L. & MacGibbon, A. (1996) Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *Int. Dairy J.* **6** (6), 539-568.

Ginger, M. & Grigor, M. (1999) Comparative aspects of milk caseins. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* **124** (2), 133-145.

Imafidon, G. *et al.* (1997) Isolation, purification and alteration of some functional groups of major milk proteins; a review. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* **37** (7), 663-689

Jayaprakasha, H. & Brueckner, H. (1999) Whey protein concentrate; a potential functional ingredient for the food industry *J Food Sci. Technol.* **36** (3), 189-204.

Rosen J. *et al.* (1999) Regulation of milk protein gene expression. *Annu. Rev. Nutr.* **19**, 407-436.

Wong, D. *et al.* (1996) Structures and functionalities of milk proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36** (8), 807-844.

甜味蛋白与其他蛋白

Anonymous (1997) Gelatin. *Adv. Polym. Sci.* **130**, 160-193.

Anupama, R. (2000) Value added food; single cell protein. *Biotechnol. Adv.* **18** (6), 459-479.

Faus, I. (2000) Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet tasting proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53** (2), 145-151.

Gibbs, B. *et al.* (1996) Sweet and taste modifying proteins; a review. *Nutr. Res.* **16** (9), 1619-1630.

Izmailova, V. *et al.* (2000) Properties of interfacial layers in multicomponent systems containing gelatin. *Colloid J.* **62** (6), 653-675.

Kuhad, R. *et al.* (1997) Mocroorganisms as an alternative source of protein. *Nutr. Rev.* **55** (3), 65-75.

Kurihara, Y. (1992) Characteristics of antisweet substances, sweet proteins and sweetness inducing proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **32** (3), 231-252.

Zemanek, E. *et al.* (1995) Issues and advances in the use of transgenic organisms for the production of thaumatin, the intensely sweet protein from thaumatococcus danielli. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35** (5), 455-466.

(阚微娜 译 谭天伟 苏国富 校)

索　引

A 蛋白层析 79
Actinoplanes missouriensis 258
B 淋巴细胞 191
Bacillu alcalophilus 246
Bacillus amylolique faciens 254
Bacillus coagulans 258
Bacillus lentus 246
Bacillus licheni formis 254，261
Bacillus stearothermophilus 279
Benefix 127
Beromun 197
BHK 细胞 126
Bio Gel P 71
BioPilot 系统 85
Bradford 方法 55
CHO 细胞 126
Curculigo lati folia 311
Demopressin 178
Demoxytocin 179
Dioscoreophyllum cummunisii 311
DNA 聚合酶 239，291
DNA 连接酶 290
Durazyme 246
Edman 降解 7
Fractogel 71，73
GRAS 33
Hartree-Lowry 方法 55
Humaspect 154
Humicola insolens 267，268
Humicola lanuginosa 275
Kluyveromyces fragilis 262
Kluyveromyces lactis 247
Kluyveromyces leuti 262
Leukine 198
Maxapem 246
Merrifield 固相多肽合成法 48
Namalwa 白细胞干扰素 186
Natuphos 284
Neupogen 199
Pentadin 311
Pentadiplandra brazzenna 311
pH 92
pH 梯度 82
Potter 组织匀浆器 56
Pseudomonas alcaligenes 275
Pseudomonas amyloderamosa 258
Pseudomonas mendocina 275
Purafect OXP 246
Regranex 174
Richadella dulcu fica 311
Sephacel 73
Sephacryl 凝胶 71
Sephadex G-25 63
Sephadex 离子交换剂 73
Sephadex 凝胶 69
Sepharose 离子交换剂 73
Sepharose 凝胶 71
T 淋巴细胞 191
T 细胞生长因子 190
Talin 310
Taq DNA 聚合酶 291
Thaumotococcus danielli 310
Thermoactinomyces vulgaris 254
Threading 24
Trichoderma longibrachiatum 267
X 射线衍射 16

A

阿拉伯半乳聚糖 270
阿拉伯聚糖 270
阿拉伯糖 270
阿斯巴甜 250
癌胚抗原 150，153
艾滋病疫苗 139
安克洛 130
氨苄青霉素 277
氨基葡聚糖 128

B

巴斯德毕赤酵母 39
白介素 189
白介素 1 193
白介素 11 193
白介素 12 194
白介素 2 190
白介素 4 194
白介素 6 194
白细胞 191
白细胞干扰素 184
百日咳表面抗原 137
败血性休克 196
半胱氨酸 91
半胱氨酸蛋白酶 244
半乳聚糖 270
半乳糖 270
半乳糖醛聚糖 270
半乳糖醛酸 269，270
6-半乳糖醛酸甲酯 270
半纤维素 264
包含体 36
胞壁酰二肽 141
被动免疫 144
焙烤食品 302
苯基-Sepharose 74
变性 1
标签 88
表面等离子体激光共振 213
表面活性剂 296
表皮生长因子 175
表皮细胞 191
丙酮 64
丙酮酸激酶 209
病毒污染 114
玻璃转变温度 95
菠萝蛋白酶 156，157，250

C

产甲烷类古细菌 237
常规安全实验 120
超滤 65，306
超排卵 170
超氧化物歧化酶 157
成淋巴细胞干扰素 185
成纤维生长因子 173，175
成纤维细胞 175，191
成纤维细胞干扰素 186
重组 DNA 技术 35
重组蛋白 88
重组凝血因子Ⅸ 127
重组牛生长激素 172
重组人 β 干扰素 187
重组人血小板生长因子 173
重组血液因子 126
重组疫苗 136
触角型离子交换剂 74
纯度 98
促红细胞生成素 173
促甲状腺激素释放激素 176
促甲状腺素 176
促卵泡成熟激素 168
促卵泡激素 169
促皮激素 177
促肾上腺皮质激素 177
促肾上腺皮质激素释放因子 177
促性腺激素 168，170
醋酸纤维素 212
醋酸纤维素膜 65
催产素 178

D

大肠杆菌 35，155，166，247，281
大肠杆菌蛋白酶 246
大豆蛋白 309
单核细胞 191
单克隆抗体 47，146
单细胞蛋白 309
单向聚丙烯酰胺凝胶电泳 98
胆固醇 208
胆固醇氧化酶 209
胆固醇酯酶 204，209
蛋白酶 107，243
蛋白质二硫键异构酶 27
蛋白质工程 27，261，276
蛋白质稳定剂 94
蛋白质杂质 119

等电点 99
等电聚焦 99，185
地衣形杆菌 246
电喷雾电离 100
淀粉 253
α-淀粉 253
淀粉降解酶 260
淀粉解凝酶杆菌 246
淀粉酶 107，253
α-淀粉酶 157，254，262
β-淀粉酶 256
淀粉水解酶 253
淀粉糖化酶 255
定点突变 27
独特表面抗原 150
断奶 282
对硝基苯磷酸 218
对香豆醇 264
多巴胺 177
多发性硬化 187
多角体蛋白 47
多聚半乳糖醛酸酶 271
多聚半乳糖醛酸内切酶 271
多聚半乳糖醛酸外切酶 271
多克隆抗体制剂 145
多肽 2
多形汉逊酵母 39

E

二甲氧苯青霉素 277
二硫键 23
二辛可宁酸法 55

F

β发夹模体 14
发射荧光法 55
反复冻融 57
方便食品 303
芳香族氨基酸 3
放射免疫分析 214
放射性同位素标记 150
非变性电泳 101
非洲奇果蛋白 311
肥大细胞 191
分析超速离心法 101
分支杆菌 141
分子伴侣 26
冯威勒布兰特病 125
弗氏不完全佐剂 141
弗氏完全佐剂 141
氟化碳 134
辅助因子 288

G

干扰素 47，184
α干扰素 184
β干扰素 186
γ干扰素 186，188
ω干扰素 188
τ干扰素 188
干重法 55
甘油 94
甘油激酶 204，209
甘油-3-磷酸脱氢酶 204
甘油-3-磷酸氧化酶 209
甘油三酯 208，209
杆状病毒表达系统 47
肝素 128
高尔基体 163
高效液相层析 83
高压灭菌 112
戈谢病 159
工业酶 229
共价交联 235
构巢曲霉 40，247
谷氨酸 93，278
谷氨酸棒状杆菌 38
谷氨酸脱氢酶 204，209
谷蛋白 250
谷胱甘肽-S-转移酶 213
骨髓干细胞 193
固定化酶 212，234
硅胶 84
果胶 269
果胶甲酯酶 271
果胶裂合外切酶 271
果胶酶 271
果胶酯酶 271

果汁提取 271
过滤 58
过滤灭菌 110
过氧化氢酶 210，289
过氧化物酶 204，209，210

H

海藻糖二霉菌酸酯 141
核磁共振 16
核酸 62
核酸酶 62，158
黑曲霉 40，255，262，284
鲎变形细胞溶解物凝结试验 116
呼吸 23
糊化 254
互补决定区 152
华法林 129
怀孕检测系统 224
环糊精 280
α-环糊精 280
β-环糊精 280
环糊精糖基转移酶 281
环状芽孢杆菌 281
黄嘌呤氧化酶 204
黄体化激素 168
黄体化激素释放因子 179
β回转 12
获得性免疫 191

J

肌胺酸激酶 204
肌醇六磷酸 283
肌醇六磷酸酶 283
肌醇六磷酸水解酶 283
基因工程 232
基质辅助激光解吸附电离 100
极端菌 236
集落刺激因子 198
己糖激酶 204
加压素 178
甲硫氨酸 91
简单蛋白 1
碱性蛋白酶 251
碱性磷酸酶 151，204
交联聚苯乙烯 84
胶原酶 156
胶质酶 107
角质细胞 191
搅拌 92
酵母 38
结合蛋白 2
结合银法 55
截留分子量 66
解冻 92
解聚酶 271
芥子醇 264
金属螯合层析 81
金属蛋白酶 244
浸麻芽孢杆菌 233
浸渍 272
精氨酸加压素 178
精氨酸酶 204
精酸胰岛素 164
巨大芽孢杆菌 281
巨人症 172
巨噬细胞 191
聚苯乙烯 222
聚焦层析 82
聚氯乙烯 65
聚碳酸酯 66，212
聚乙二醇 61，64，94
聚乙烯亚胺 62

K

抗独特型抗体 138
抗坏血酸氧化酶 204
抗利尿激素 178
抗体 147，214
抗体-毒素耦联物 151
抗体-酶耦联物 151
α_1-抗胰蛋白酶 133
克隆酶免疫分析 219
克-雅病致病因子 172
空间排阻层析 68
枯草杆菌蛋白酶 241
枯草杆菌蛋白酶亚族 246
枯草芽孢杆菌 281，283
快速蛋白质液相层析 85

L

赖氨酸 278
赖氨酸加压素 178
蓝葡聚糖 80
酪蛋白 298
κ-酪蛋白 298
类胰岛素生长因子 172
冷冻 92
冷冻干燥 94
离心 58
离液剂 90
离子交换层析 71
离子交换介质 65
链激酶 132
链霉菌 38
亮氨酸脑啡肽 43
裂变酵母 39
裂合酶 271
临床化学 202
淋巴脉络丛脑膜炎病毒 114
磷酸钙-纤维素凝胶 82
磷酸化 20
磷酸铝 141
磷酸酶 92
磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 204
硫酸盐还原类古细菌 237
卵类黏蛋白 309
卵黏蛋白 309
卵清蛋白 308
卵铁传递蛋白 309
α螺旋 11
螺旋束 14

M

吗啡 40
麦芽糊精 260
慢性肉芽肿病 188
毛细管电泳 99
酶电极 212
酶多重免疫分析技术 215，216
酶径向扩散 286
酶联免疫吸附分析 215
酶免疫分析 215
酶制剂 108
米曲霉 40，255，268
泌乳刺激素 177
免疫干扰素 186
免疫亲和层析 78，185
免疫球蛋白 146，309
明胶 307
膜层析 87
膜过滤 59
木瓜蛋白酶 41，156，157，248，250，252
木瓜凝乳蛋白酶 156
木聚糖酶 283
木糖 270
木质素 264

N

囊性纤维症 158
脑垂体 169
内毒素 115
内肽酶 243
嫩化 248
酿酒酵母 38，137，198，247，255
尿激酶 131
尿素 90，209
尿素酶 209
尿酸 209
尿酸酶 204，210
尿抑胃素 175
脲酶 204
凝集素亲和层析 79
凝胶包埋 234
凝胶过滤层析 68
凝胶过滤分析 101
凝胶渗透层析 68
凝乳酶 247
凝血酶 124
牛痘苗病毒 138
牛海绵状组织性脑炎 44
β-牛乳糖苷酶 262
牛血红蛋白 134
牛血清白蛋白 305
牛胰岛素 164
农杆菌 41
浓缩 63

O

欧洲水蛭 129

P

喷雾干燥 108
膨胀床层析 85
批量酶 229
皮革生产 249
平滑肌细胞 191
破伤风疫苗 137
β-葡聚糖 282
β-葡聚糖酶 282
葡聚糖外切酶 266
葡糖脑苷脂酶 159
葡萄球菌激酶 132
葡萄糖淀粉酶 255
α1→6 葡萄糖苷酶 257
β-葡萄糖苷酶 266
葡萄糖浆 260
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 204
葡萄糖氧化酶 204，207，210，289
葡萄糖异构酶 34，235，258

Q

奇甜蛋白 310
前胰岛素原 162
嵌合抗体 152
羟基磷灰石层析 81
切割片段长度多态性分析 292
亲和层析 76
青霉素 277
青霉素 G 277，278
青霉素 V 277
青霉素酰化酶 277
青霉素酰基转移酶 34
氢氧化铝 141
氢氧化钠 112
清创剂 156
清洁 111
清洁区 111
琼脂糖 77
球状蛋白 1
曲古霉菌 247
曲霉属 40
去垢剂 90
去污剂 57
全血 122
醛脱氢酶 210

R

染料亲和层析 80，186
热变菌 237
热球菌 237
热原生质体 237
热原质 115
人免疫缺陷病毒 44
人绒毛膜促性腺激素 168
人乳铁蛋白 40
人生长激素 172
人体免疫缺陷病毒 219
人血红蛋白 134
人血清白蛋白 132
人胰岛素 165
人源化单抗 153
人组织纤溶酶原激活剂 28，45
溶菌酶 27，252，309
熔球态 26
融合蛋白 89
肉豆蔻酰化 21
肉制品 303
乳化剂 296
乳胶 222
乳清 262
α-乳清蛋白 304
β-乳球蛋白 301，304
乳酸克鲁维酵母 39
乳酸乳球菌 38
乳酸脱氢酶 76，209
乳糖 297
乳糖酶 157，262
乳汁 297
乳制品 302

S

三氯乙酸沉淀法 55
砂洗 269
上浆 261

上游 104
渗滤 67
渗压休克 57
生长调节素 172
生长激素 171
生长激素释放因子 171，179
生长激素抑制素 179
生物传感器 210
生物抛光 269
生物特异亲和层析 76
生物质 263
失活 89
施旺酵母 39
嗜热菌 237
嗜热厌氧菌 233
嗜热脂肪芽孢杆菌 281
嗜曙红细胞 191
嗜盐菌 240
疏水作用层析 74
鼠李半乳聚糖 270
鼠李糖 270
鼠乳清酸性蛋白 45
双水相分离 60
双水相分离层析 83
双缩脲法 55
双香豆素 129
双向电泳 99
水蛭素 129
丝氨酸蛋白酶 130，244
丝氨酸蛋白抑制剂 133
丝氨酸水解酶 274
松柏醇 264
松软产品 303
苏氨酸 278

T

肽基脯氨酰异构酶 27
肽键 6
糖 94
糖果 302
糖基化 18
糖酶 92
糖尿病 162
特异肿瘤表面抗原 140
天冬氨酸 93
天冬氨酸蛋白酶 244
天冬氨酰苯丙氨酸甲酯 279
天冬酰胺酶 34，155
天然胰岛素 167
甜食 302
β桶 14
筒式滤器 66
兔试验 116
脱浆 262
脱墨 269
脱酰胺胰岛素 164

W

外肽酶 243
β弯曲 12
微过滤 59
微生物污染 113
韦林搅切器 57
维生素 K 127
胃蛋白酶 157
温度 92
无花果蛋白酶 41
戊二醛 134
戊聚糖 283
戊聚糖酶 283

X

吸附 234
硒代半胱氨酸 5
洗涤剂 245，261，275
细胞破碎 56
细胞因子 183
下游处理 104
仙茅甜蛋白 311
仙台病毒 186
先天性免疫 190
纤维蛋白溶酶 130
纤维蛋白溶酶原 130
纤维蛋白稳定因子 124
纤维二糖水解酶 266
纤维聚糖酶 266
纤维素 263
纤维素结合域 267

纤维素离子交换剂 73
纤维素酶 265
纤维素内切酶 266
纤维状蛋白 1
酰化 21
酰化氨基酸水解酶 235，279
限制性核酸内切酶 289
硝酸纤维素膜 65
心肌梗死 128
辛基-Sepharose 74
锌 163，164
星形胶质细胞 191
溴化氰激活 77
血管内皮细胞 191
血红蛋白 134
血浆 123
血浆脂蛋白 208
血栓 128
血糖测量 207
血小板源生长因子 173
血液凝集途径 124
血液凝集因子 123
血友病 A 125
血友病 B 125

Y

亚胺二乙酸 81
亚油酸 289
盐出效应 64
盐入效应 63
盐酸胍 90
氧化还原酶 288
叶状硫细菌 237
胰蛋白酶 156，165
胰岛素 43，162
胰岛素二聚体 164
胰岛素样生长因子 174
胰岛素酯 164
胰岛 β 细胞 162
胰高血糖素 167
胰酶 157
胰凝乳蛋白酶 156
胰凝乳酶 247
乙醇 64
乙醇脱氢酶 204
乙肝表面抗原 137
乙醚 64
N-乙酰胞壁酸-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺 141
乙酰胆碱酯酶 204
乙酰化 21
异丙醇 64
异常毒性实验 120
抑制素 171
疫苗 135
意大利食品 303
阴离子交换层析 72
饮料 302
隐形眼镜 252
茚三酮法 55
应乐果甜蛋白 311
婴儿食品 303
右旋糖苷 61
羽毛废弃物 251
原位清洁 112
圆柱假丝酵母 276
匀浆 57
孕马血清促性腺激素 170

Z

杂交瘤技术 148
造血细胞 191
β 折叠 11
β 折叠股 12
β 折叠片 12
折叠途径 25
蔗糖酶 263
蒸汽灭菌 110
支链淀粉 253
肢端肥大症 172
脂多糖 116，117
脂肪酶 209，274
脂肪氧化酶 289
脂肪族氨基酸 3
脂类 62
植酸 34，283
植酸酶 34
质谱 8，99
中空纤维 66

肿瘤表面抗原 150，153
肿瘤坏死因子 195
α肿瘤坏死因子 195
β肿瘤坏死因子 197
肿瘤疫苗 140
重金属 90
侏儒症 172
猪胰岛素 164，165
主动免疫 144
注射用水 111
柱层析技术 67
转化生长因子 173，176
转基因动物 44
紫丁 240
紫膜质 240
自然杀伤细胞 191
组织纤溶酶原激活剂 131
佐剂 141